

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**TÜMÖR PROGRESYONUNUN ÖNLENMESİ İÇİN
PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE,
PKC δ ve PKC ϵ ' nun CDME TARAFINDAN KONTROLÜ**

Nilgün GÜRBÜZ

Doktora Tezi

Antalya, 2010

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

TÜMÖR PROGRESYONUNUN ÖNLENMESİ İÇİN
PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE,
PKC δ ve PKC ϵ ' nun CDME TARAFINDAN KONTROLÜ

Nilgün GÜRBÜZ

Doktora Tezi

Tez Danışmanı:
Prof.Dr. Aslı BAYKAL

II. Danışman:
Prof.Dr. Suresh C. SIKKA

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı Enstitü Kurul Kararı ve Akdeniz Üniversitesi Senatosu'nun 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı Senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora anabilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayın aşağıdadır (Orjinali ekte sunulmuştur).

- 1) **Gurbuz N**, Aksu TA, Van Noorden CJF: Biochemical and cytochemical evaluation of heterozygote individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Acta Histochem. 2005;107(4):261-7. Epub 2005 Sep 1.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu alışma jürimiz tarafından, Tıbbi Biyokimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. /...../2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Aslı BAYKAL ATAMAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Tomris ÖZBEN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Mustafa Faruk USTA
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üroloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Sevgi AKAYDIN
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../.....tarih ve/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Prostat kanserinin moleküler temeli, tümör baskılayıcı pro-apoptotik bir protein olan PKC δ 'nın inaktivasyonu ile ve büyümeyi indükleyen onkojenik bir protein olan PKC ϵ 'nin aktivasyonu ile kuvvetle ilişkilidir. Çünkü kanserde bozulan oksidatif şartlar, sistince zengin olan her iki PKC izozimini öncelikli olarak hedef alarak yapılarında değişikliğe neden olur. Tiyol antioksidanların disülfid formları, S-sisteinilasyon mekanizması aracılığıyla (PKC-S-S-Cys) PKC izozimleri ile ilişkiye girerek aktivitelerinde belirgin değişikliklere yol açar. Çalışmamızda, sistinin metabolik bir prekürsörü olan sistin dimetil estere (CDME) cevaben gelişen PKC δ ve PKC ϵ oksidatif regülasyonunun farklı prostat kanseri hücrelerinde incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, kontrol hücresi olan RWPE-1'de (nontümörjenik prostat epitelyum hücre dizisi) ve prostat kanser hücreleri olan LNCaP'de (androjen-bağımlı prostat kanseri hücre dizisi) ve PC3'de (androjen-bağımsız prostat kanseri hücre dizisi); ileri analizler için uygulanacak CDME dozunu seçmek amacıyla WST-8'in formaza indirgenmesi temeline dayanan hücre sitotoksitesite deneyi, CDME muamelesini takiben hücre içi sistin düzeylerini ölçmek için radyoaktif sistin bağlayıcı protein (CBP) analizi, CDME-indüklü apoptozisi değerlendirmek için DNA fragmentasyonu ve Kalsein-AM deneyleri, PKC δ ve PKC ϵ enzim aktivitelerini tayin etmek için nonradyoaktif analiz ve protein ekspresyonlarını göstermek için ise western blot deneyleri yapıldı. Bulgularımız, doz artışına paralel olarak 0.5mM ve 5mM CDME'nin, önce hücre içi sistin düzeylerini takibinde de özellikle prostat kanseri hücrelerinin apoptozisini arttırdığını göstermiştir. CDME'nin bu etkisini ise PKC δ aktivasyonu ve PKC ϵ inaktivasyonu üzerinden gerçekleştirdiğini saptadık. Ayrıca, PKC δ genine spesifik küçük interferans RNA (siRNA) ile yapılan analizler PC3 hücrelerinin ölümünün PKC δ 'ya bağımlı olduğunu ifade etmiştir. Kontrol hücreye kıyasla özellikle prostat kanseri hücrelerinde gözlemlediğimiz bu sonuçlar, CDME'nin prostat kanseri tedavisinde kullanılacak olası terapötik ajanlardan biri olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, PKC δ , PKC ϵ , sistin, CDME, apoptozis

ABSTRACT

The molecular basis of prostate cancer is strongly related with inactivation of pro-apoptotic, tumor-suppressive isozyme protein kinase C- δ (PKC δ) and activation of growth-stimulatory, oncogenic isozyme PKC ϵ . Oxidative conditions altered in cancer lead to change the structure both of PKC isozymes containing cysteine rich residues. Disulfide forms of thiol antioxidants induce marked changes in PKC isozyme activity via S-cysteinylation (PKC-S-S-Cys), e.g. PKC δ stimulation and PKC ϵ inactivation. We aimed to investigate the oxidative regulatory responses of PKC δ and PKC ϵ to cystine dimethylester (CDME), a metabolic precursor of cystine, in various prostate cancer cells. For this purpose, cell cytotoxicity to select CDME doses for further assays by WST-8 assay based on the reduction of WST-8 to formazan, CDME-induced intracellular cystine levels by radioactive cystine binding protein (CBP) assay, apoptosis by DNA fragmentation and Calcein AM assays, the protein expressions of PKC δ and PKC ϵ by western blot, and both PKC enzyme activities by nonradioactive assay were performed in prostate cancer cells, LNCaP (androgen-dependent prostate cancer cell line) and PC3 (androgen-independent prostate cancer cell line), and RWPE-1 (nontumorigenic prostate epithelial cell line) used as control. Our findings showed that 0.5 mM and 5 mM CDME induced intracellular cystine levels and then apoptosis depending on enhanced concentration of CDME especially in prostate cancer cells. Additionally, we obtained that this effect of CDME arised from activation of PKC δ and inactivation of PKC ϵ . The inhibition of PKC δ gene expression by specific small interfering RNA (siRNA) proved the cell death of PC3 depending on PKC δ . These findings obtained in prostate cancer cells compared with control cell provide that CDME may be one of the potential therapeutic agents to use in prostate cancer therapy.

Keywords: Prostate cancer, PKC δ , PKC ϵ , cystine, CDME, apoptosis

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tulane Üniversitesi Tıp Fakóltesi Üroloji Bölümü ve Virginia Commonwealth Üniversitesi Massey Kanser Merkezi'nde yapmış olduğum bu araştırmanın, planlanması ve gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübesiyle yardımlarını esirgemeyen, proje yürütücüsü ve akademik danışmanım, değerli hocam Sayın Prof.Dr.Aslı BAYKAL başta olmak üzere,

Amerika Birleşik Devletlerinde çalıştığım süre boyunca gerek bilimsel anlamda gerekse laboratuvar imkanları açısından yardım ve desteklerini esirgemeyerek bana çok katkı sağlayan ikinci tez danışmanım olan Sayın Prof.Dr. Suresh C. SIKKA'ya, ayrıca Prof.Dr. Paul DENT'e ve Prof.Dr. Asim Abdel-Mageed'e,

Hem Tulane hem de Virginia Commonwealth Üniversitesindeki çalışmalarım sırasında yöntemler konusunda tecrübesiyle bana yardımcı olan dostum Sayın Dr. Margaret Amy PARK'a,

Doktora eğitimim süresince öğrenimime katkı sağlayan bölüm hocalarıma,

Sonsuz destekleri ve sabırları için aileme en içten saygılarımı ve sevgilerimi sunarım.

Nilgün GÜRBÜZ

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Karsinogenezis	4
2.2. Prostat Kanseri	4
2.3. Prostat Kanseri Risk Faktörleri	5
2.3.1. Yaş	5
2.3.2. Diyet	6
2.3.3. Etnik Özellikler ve Çevresel Faktörler	6
2.3.4. Genetik Polimorfizm	6
2.4. Prostat Kanseri Oluşumunda ve Progresyonunda Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar	7
2.4.1. Androjen Reseptörünün Etkileri	7
2.4.2. Androjenler ve Büyüme Faktörleri	8
2.4.3. Proliferatif Hücre İçi Sinyal Yolakları	9
2.4.4. Programlı Hücre Ölümü (Apoptozis)	12
2.4.5. Prostat Kanserinde En Sık Saptanan Genetik Değişiklikler	14
2.5. PKC	15
2.5.1. PKC'nin Yapısı	16
2.5.2. PKC'nin Fonksiyonları	17
2.5.3. PKC'nin Sinyalizasyonu ve Oksidatif Stres	17
2.5.4. PKC'nin Kanser Progresyonuna olan Etkileri	18
2.6. PKCδ	19
2.6.1. PKCδ'nin Apoptozis Üzerindeki Etkileri	19
2.6.2. PKCδ'nin Hücre Siklusu Üzerindeki Etkileri	21
2.7. PKCε	22
2.7.1. PKCε'nun Apoptozis Üzerindeki Etkileri	22

2.7.2. PKCε'nun Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkileri	23
2.8. PKCδ ve PKCε'nun S-tiyolasyonu	25
MATERYAL ve METOD	29
3.1. Hücre Kültürü	29
3.2. WST-8 Deneyi	30
3.3. CBP Ölçümü	32
3.4. Kalsein AM Deneyi	34
3.5. DNA Fragmantasyonu	35
3.6. PKCδ ve PKCε'nun Immunoblot Analizi ile Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi	37
3.6.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması	37
3.6.2. Protein Miktar Tayini	38
3.6.3. PKCδ ve PKCε'nun Immunoblot Analizi	39
3.7. PKCδ ve PKCε'nun Immunpresipitasyonu ve Enzim Aktivitesi Ölçümü	41
3.7.1. Immunpresipitasyon	41
3.7.2. PKCδ ve PKCε Enzim Aktivitesi	43
3.8. PKCδ Gen Ekspresyonunun siRNA ile İnhibisyonu	44
3.9. PKCδ Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile Analizi	45
3.9.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu	45
3.9.2. RT-PCR Analizi	46
3.10. Tripan Mavi ile Hücre Canlılığının Tespiti	46
BULGULAR	48
4.1. Hücre Sitotoksite Ölçümü	48
4.2. CBP Düzeyleri	49
4.3. Apoptozisin Değerlendirilmesi	50
4.4. DNA Fragmantasyonunun Değerlendirilmesi	53
4.5. PKCδ ve PKCε'nun Protein Ekspresyon Düzeyleri	54
4.6. PKCδ ve PKCε'nun Enzim Aktivite Düzeyleri	57
4.7. PKCδ siRNA ile PRKCD'nin İnhibisyonu ve Hücre Ölümü Oranları	59
TARTIŞMA	62
SONUÇLAR	74
KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	88
EKLER	89
Ek-1: Biochemical and cytochemical evaluation of heterozygote individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

1-metoksi PMS	:	1-metoksi Fenazin Metosülfat
ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
AIF	:	Apoptosis İndükleyici Faktör
Apaf-1	:	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
APS	:	Amonyum Persülfat
AR	:	Androjen Reseptörü
ATP	:	Adenozin Trifosfat
BCA	:	Bikinkoninik Asit
BCP	:	1-bromo-3-kloropropan
BPH	:	Benign Prostat Hiperplazisi
CAK	:	Siklin Aktive Edici Kinaz
CDK	:	Siklin Bağımlı Kinaz
CDME	:	Sistin Dimetil Ester
COX-2	:	Siklo-oksijenaz-2
CSF	:	Koloni Uyarıcı Faktör
DAG	:	Diaçil Gliserol
DFE	:	DNA Fragmente Edici Faktör
DHT	:	Dihidrotestesteron
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DNA-PK	:	DNA-Bağımlı Protein Kinaz
DTT	:	Ditiyotritol
EDTA	:	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGF	:	Epidermal Büyüme Faktörü
ER	:	Endoplazmik Retikulum
ERK	:	Ekstraselüler Sinyal Regülasyonlu Kinaz
FADD	:	Fas İlişkili Ölüm Birimi
FAK	:	Fokal Adezyon Kinaz
FBS	:	Fetal Sığır Serumumu
bFGF	:	bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
GSH	:	Redükte Glutasyon
GSSG	:	Okside Glutasyon
GST-pi	:	Glutasyon-S-transferaz-pi
GTPaz	:	Guanozin Trifosfaz
HER2/neu	:	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2
HIF-1α	:	Hipoksi Uyarıcı Faktör-1 α
IAP	:	Apoptosis İnhibitor Protein
IGF	:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGF-BP	:	IGF-Bağlayıcı Protein
IKK	:	I κ B Kinaz

IL-6	:	İnterlökin-6
JNK	:	c-Jun N-Terminal Kinaz
KGF	:	Keratinosit Büyüme Faktörü
LNCaP	:	Lenf Nodu Metastazlı Prostat Kanseri
MAPK	:	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MAPKK	:	MAPK Kinaz
MAPKKK	:	MAPK Kinaz Kinaz
MARCKS	:	Miristollenmiş Alaninden Zengin C-Kinaz Substratı
MMP-9	:	Matriks Metallo Proteinaz-9
NFκB	:	Nükleer Faktör-kappaB
NGF	:	Nöron Büyüme Faktörü
eNOS	:	endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
PARP	:	Poli-Adenozin Difosfat Riboz-Polimeraz
PBS	:	Fosfat Tamponlu Tuz
PC3	:	Prostat Karsinoma-3
PDK	:	Fosfotidil İnozitol-3 Fosfat Bağımlı Kinaz
PI3K	:	Fosfatidil İnozitol-3 Kinaz
PI3P	:	Fosfotidil İnozitol-3 Fosfat
PKB	:	Protein Kinaz-B
PKC	:	Protein Kinaz-C
PKCδ -CF	:	PKCδ-Katalitik Fraksiyonu
PLA2	:	Fosfolipaz A2
PMA	:	Forbol Miristat Asetat
PMSF	:	Fenilmetilsülfonil Florid
PRKCD	:	PKCδ geni
PSA	:	Prostat Spesifik Antijeni
PTEN	:	Fosfataz ve Tensin Homoloğu
RISC	:	RNA-indüklü Susturucu Kompleks
ROS	:	Reaktif Oksijen Ürünleri
RPMI	:	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	:	Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RWPE-1	:	Nontümörijenik Prostat Epitelyum Hücresi
SBP	:	Sistin Bağlayıcı Protein
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	:	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
siRNA	:	Küçük İnterferans RNA
Smac/DIABLO	:	Sekonder Mitokondri Türevli Kaspazlar/Direkt Apoptozis İnhibitorünü Bağlayıcı Protein
SSA	:	Sülfosalisilik Asit
STAT3	:	Sinyal İletim ve Transkripsiyon Aktivatörü-3
TEMED	:	N, N, N', N'-tetrametiletildiamin
TGF-α	:	Transforme Edici Büyüme Faktörü-α
TNF-α	:	Tümör Nekrozis Faktör-α
TNFR-1	:	TNF Reseptörü-1
TPA	:	Doku Plazminojen Aktivatörü

TRADD	:	TNFR-1 İlişkili Ölüm Birimleri
TRAIL	:	TNF İlişkili Apoptozisi İndükleyen Ligand
Trx	:	Tiyoredoksin
UV	:	Ultraviyole
VEGF	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WST-8	:	Suda Çözünebilen Tetrazolyum Tuzu-8

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. 2008 yılı itibariyle farklı tipteki kanser olgularının tahmini sayıları ve ölüm oranları	5
2.2. Prostat kanserinde AR sinyalizasyonu	8
2.3. MAPK sinyal yollarının aktivasyonu	9
2.4. PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonu ve regülasyonu	10
2.5. NFkB/IkB sinyal yollarının aktivasyonu	11
2.6. Hücre içi ekstrinsik ve intrinsik apoptotik yollar	13
2.7. PKC'nin katalitik ve regülatör alt birimleri içerisinde bulunan oksidatif hassasiyete sahip kısımlar	18
2.8. Apoptotik uyarılara cevaben uyarılan PKC δ 'nın hücre içi hedefleri	21
2.9. Hücre proliferasyonunun ve hücre ölümünün PKC ϵ tarafından kontrolü	24
2.10. PKC δ ve PKC ϵ 'nin hücre proliferasyonu ve apoptozisi üzerindeki zıt etkileri	25
2.11. Protein S-tiyolasyon mekanizması	27
3.1. WST-8'in formazana indirgenmesi	30
3.2. Hücrelerin, sitotoksosite deneyi için 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki dağılımı	31
3.3. Kalsein AM'nin, hücre içi esterazlar tarafından kalseine hidrolizi	34
3.4. BCA yöntemine göre elde edilen protein standart grafiği	38
4.1. 0.005mM, 0.05mM, 0.5mM, 5mM ve 20mM CDME dozlarının, RWPE-1, PC3 ve LNCaP hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkileri.	48
4.2. 0.5mM ve 5mM CDME muamelesini takiben, RWPE-1'de (A) PC3'de (B) ve LNCaP'de (C) değişen hücre içi sistin düzeyleri	50
4.3. 0.5mM ve 5mM CDME muamelesine yanıt olarak, RWPE-1 (A), PC3 (B) ve LNCaP (C) hücrelerinde değişen apoptotik oranların ayrı ayrı ve birbirleriyle kıyaslanarak (D) değişimi	52
4.4. RWPE-1 (A), LNCaP (B) ve PC3 (C) hücrelerinde CDME'nin DNA fragmentasyonu üzerine olan etkisi.	53
4.5A. RWPE-1 (a), PC3 (b) ve LNCaP (c) hücrelerinde, CDME'nin PKC δ protein ekspresyonları üzerine etkisi.	55
4.5B. RWPE-1 (a), PC3 (b) ve LNCaP (c) hücrelerinde, CDME'nin PKC ϵ protein ekspresyonları üzerine etkisi.	56

4.6. RWPE-1, PC3 ve LNCaP hücrelerinde, CDME'nin PKC δ ve PKC ϵ aktivitesi üzerine etkisi.	58
4.7. RWPE-1 ve PC3 hücrelerinde PRKCD-siRNA aracılığıyla gerçekleşen PRKCD-mRNA'nın inhibisyonu.	60
4.8. PRKCD-siRNA aracılığıyla gerçekleşen PRKCD-mRNA inhibisyonunun, CDME-indüklü RWPE-1 (<i>A</i>) ve PC3 (<i>B</i>) hücrelerinin ölümü üzerindeki etkisi.	61
5.1. CDME'nin moleküler yapısı	71
5.2. LNCaP ve PC3 hücrelerinde CDME indüksiyonu takibinde gelişen PKC δ aktivasyonu/PKC ϵ inaktivasyonu ve apoptozis	72

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. PKC izoformlarının aminoasit sayıları ve moleköl ağırlıkları	16
3.1. Ayrıştırma ve yükleme jellerinin hazırlanması	40
3.2. PKC enzim aktivite ölçümü için numune, pozitif ve negatif kontrol tüplerinin hazırlanması	43

GİRİŞ ve AMAÇ

Prostat kanseri, günümüzde halen en sık tanı konulan ve ikinci en sık ölümcül olan kanser tipidir [1]. Bu nedenle prostat kanserinin moleküler mekanizmalarının tanımlanması, yeni ve daha etkin terapötik ajanların bulunması açısından çok önemlidir. Karsinogenezis, birçok aşamaları içeren bir patogenezdır. Bu aşamalar temel olarak, normal bir hücrenin kanser hücresine transforme olmasıyla başlar, oluşan bu tümörün çoğalması ve büyümesi ile devam eder ve en nihayetinde başka dokulara invaze olup metastaz yapması ile sonuçlanır. Birçok hücrenel mekanizmalar, bu süreçlerin gelişimine katkıda bulunur. Bunlar arasında DNA tamir mekanizmalarının bozulması, hücre siklusunun ve mitojenik aktivitenin aşırı derecede artması, anjiyogenezin artması, buna karşılık hücre-hücre etkileşiminin ve programlı hücre ölümü olan apoptozisin azalması yer alır. Bu hücrenel olaylarda kilit rol oynayan önemli mediyatörlerin, ya genetik mutasyona uğramaları sonucunda ya da ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler sonucunda aktive veya inaktive olması tümör gelişimine ve progresyonuna neden olur [2]. Prostat kanserinin gelişmesine katkıda bulunan çeşitli mutasyonlar ve ekspresyon değişiklikleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında en önemlisi androjen reseptörünün (AR) geninde meydana gelen mutasyon sonucunda, AR'nin sadece androjen tarafından değil diğer steroidler tarafından da aktive edilebilmesidir. Ayrıca yine AR ile ilişkili olarak, Her2/neu gibi bazı onkogenlerin aktive olması ligand bağımsız olarak AR'nin sürekli uyarılmasına yol açar [3]. Özellikle prostat kanserinde gözlenen diğer önemli bir mutasyon ise fosfataz ve tensin homologunu (PTEN) kodlayan gende gözlenir. Bu mutasyon sonucunda PTEN'in inhibe olmasından dolayı, PTEN'in hücre canlılığının sağlanmasında çok etkin bir yolak olan Akt yolağı üzerindeki baskılayıcı etki ortadan kalkar ve bir taraftan hücre proliferasyonu artarken diğer taraftan apoptozis azalır [4]. Bunun dışında; tüm kanser tiplerinin %30'unda gözlenen tümör baskılayıcı gen p53 ve myc proto-onkogeninin mutasyonu ile anti-apoptotik olan Bcl-2'nin, anjiyogenezin ana mediyatörlerinden biri olan vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) ve matriks metalloproteinazların aşırı aktivasyonları, prostat kanseri ile ilişkili olan önemli hücrenel değişikliklerinden bazılarıdır.

Prostat kanserinin gelişimine katılan hücre içi sinyal mekanizmaları arasında protein kinaz C (PKC) ailesi oldukça önemli bir yere sahiptir. Çünkü PKC'nin üyeleri, hücre siklusundan DNA tamirine, apoptozisten invazyona kadar birçok önemli hücrenel mekanizmalarda kilit öneme sahip mediyatörler ile direkt etkileşimlere girer [5]. Yalnız, 12 farklı izozime sahip olan PKC ailesinin tüm üyeleri bahsedilen hücrenel olaylarda aynı yönde etkiye sahip değildir, hatta tam zıt etkilere sahip olan üyeleri bulunur. PKC δ ve PKC ϵ , bu konuda verilebilecek en güzel örnek çiftidir. PKC δ , hücre siklusunu inhibe etmesi, DNA tamirini düzenlemesi ve programlı hücre ölümünü indüklemesi nedeniyle büyümeyi inhibe edici etkiye sahiptir, hatta bu nedenle pro-apoptotik protein olarak adlandırılır. Tam tersi olarak PKC ϵ ise, mitojenik aktiviteyi arttıran hücre içi yolları

uyarması, hücre siklusunu indüklemesi, apoptozisi inhibe etmesinden dolayı büyümeyi indükleyici etkiye sahiptir ve bu nedenle PKC ailesinin onkojenik potansiyele sahip yegane üyesi olan PKC ϵ , onkojenik protein olarak adlandırılır [6].

Prostat kanserinin de dahil olduğu birçok kanser hücresinde, PKC δ aktivasyonu inhibe olurken PKC ϵ aktivitesi stimüle olur ve sonuçta apoptozis baskılarak kanser hücrelerinin proliferasyonu artar. Bunun en muhtemel nedeni, bu iki PKC izoziminin kanserde oksidatif modifikasyona uğramasıdır [7]. PKC δ ve PKC ϵ 'nin aktivasyonu için gerekli olan diaçilgliserol (DAG), enzimin regülatör kısmına bağlanır. Bu kısım ise enzimin regülasyonunda çok önemli olup, hem PKC δ 'da hem de PKC ϵ 'da her bir yapıda 6 sistein olacak şekilde iki Zn²⁺ parmak yapısını içermektedir. Buna ilaveten katalitik kısım da 5-8 sistein birimi içermektedir. Yapısında toplam 16-28 sistein birimi içeren her iki PKC izozimi, sisteince zengindir. Bundan dolayı da, pro-oksidan şartlar veya oksidatif stres aracılığıyla sistein birimlerinde değişiklik meydana gelir. S-tiyolasyon olarak adlandırılan bu olay geri dönüşümlüdür ve PKC δ ve PKC ϵ 'nu geri dönüşümsüz hasardan koruyan adaptif bir mekanizmadır. Ancak enzimlerin fonksiyonlarının değişmesine neden olmaktadır. Kanserde PKC δ inaktivasyonunun ve PKC ϵ aktivasyonunun gözlenmesi bundan dolayıdır. Bu iki PKC izozimini regüle etmesi amacıyla diamid, okside glutatyon (GSSG), sistin, sistamin, (Cys-Gly)₂ gibi birçok disülfid ajan denenmiş olup en etkin sonuç sistamin indüksiyonunda elde edilmiştir. Pürifiye PKC δ ve PKC ϵ 'nin sistamin ile muamele edilmesi sonucunda PKC δ aktivasyonunun arttığı, PKC ϵ 'nunkinin ise azaldığı tespit edilmiştir [8].

Bu bulgulardan yola çıkarak çalışmamızda sistin prekürsörü bir ajan olan sistin dimetil esterinin (CDME), PKC δ ve PKC ϵ 'nin regülasyonu aracılığıyla prostat kanseri hücrelerinin progresyonu üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçladık. Daha önce yapılan çalışmaların bulgularını baz alarak CDME'nin PKC δ 'yi aktive PKC ϵ 'nu ise inaktive ederek prostat kanseri hücrelerini apoptoza götürebileceğini hipotez ettik. Bu hipotezi analiz etmek amacıyla deneyler, nontümörijenik prostat epitelyum hücresi (RWPE-1) ile androjen-bağımlı (LNCaP) ve androjen-bağımsız (PC3) olmak üzere epitelyum kökenli iki farklı prostat kanseri hücresinde yapıldı. Tüm hücrelerin CDME ile indüklenmesini takiben, sistin bağlayıcı protein (CBP) deneyi aracılığıyla hücre içi sistin miktarı, western blot analizi aracılığıyla PKC δ ve PKC ϵ protein ekspresyonu, Kalsein-AM ve DNA fragmentasyon analizi ile apoptozis oranlarını ve immunpresipite numunelerde PKC δ ve PKC ϵ enzim aktiviteleri tespit edildi. Hücrelerin muamele edileceği CDME'nin dozu ise, suda çözünebilen tetrazolyum tuzu-8 (WST-8)'in kullanıldığı hücre sitotoksitesisi deneyi ile seçildi. CDME indüksiyonunu takiben prostat kanseri hücrelerinde gerçekleşen tüm ölçüm sonuçları kontrol hücrenin sonuçları ile kıyaslanarak, CDME'nin prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkinliği değerlendirildi.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular, CDME'nin kontrol hücrenin aksine hem androjen-bağımlı hem de androjen-bağımsız prostat epitelyum kanser hücrelerinin apoptozisini uyarak tümör progresyonunu önlediğini göstermiştir. Yaptığımız ileri analizlerle bu sonucu bir adım ileriye götürerek, CDME'nin bu etkisini prostat kanserinin progresyonunda tam ters etkilere sahip olan PKC δ ve PKC ϵ üzerinden

gerçekleştirdiğini saptadık. Her iki prostat kanser hücresinde CDME'nin, prostat kanserinde ekspresyonu ve aktivitesi azalan pro-apoptotik PKC δ 'nın aktive olmasına, tam tersi olarak ekspresyonu ve aktivitesi artan onkojenik PKC ϵ 'nin ise inaktive olmasına neden olduğunu saptadık. Lipofilik yapısından dolayı CDME'nin hem hücreler tarafından daha kolay alınması hem de enzimin katalitik ve regülatör birimlerindeki sistein birimleri ile interaksiyona girmesi, CDME'nin PKC regülasyonundaki etkinliğini açıklamaktadır. Apoptozisde kaydedilen verilerde olduğu gibi, CDME'nin bu iki PKC izozimi üzerindeki regüle edici etkisi yine kontrol hücrenin aksine belirgin olarak her iki prostat kanseri hücresinde ortaya çıkmıştır. Bu iki farklı prostat kanseri hücresinin CDME muamelesine verdiği yanıtı kıyasladığımızda ise, androjen-bağımsız olan PC3'e nazaran androjen-bağımlı olan LNCaP'nin CDME'e daha çok hassas olduğu tespitinde bulunduk. CDME'nin hangi PKC izozimi üzerinde daha etkin olduğunu incelediğimizde de, PKC ϵ 'e kıyasla PKC δ 'nın CDME indüksiyonuna daha duyarlı olduğunu gözlemledik. PKC δ 'ya nazaran daha agresif karakterde olan onkojenik PKC ϵ , CDME tarafından regüle edilebilmesi için daha yüksek CDME dozlarına ihtiyaç duymaktadır.

CDME'nin kontrol hücreye kıyasla prostat kanseri hücrelerindeki anti-proliferatif etkisi, CDME'nin prostat kanseri tedavisinde kullanılacak olası terapötik ajanlardan biri olabileceğini göstermektedir. Çünkü genel olarak kanser tedavilerinde karşılaşılan en önemli sorun, verilen terapötik ajanın kanser hücrelerini öldürdüğü gibi normal hücrelere de zarar vermesidir. Bilgilerimiz dahilinde, CDME'nin PKC δ aktivasyonu ve PKC ϵ inaktivasyonu üzerinden prostat kanseri progresyonunu önlediği ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir. Bu nedenle elde ettiğimiz etkili sonuçların, sonraki çalışmalarımıza ve diğer araştırmacılara yeni fikirler vereceğini düşünmekteyiz.

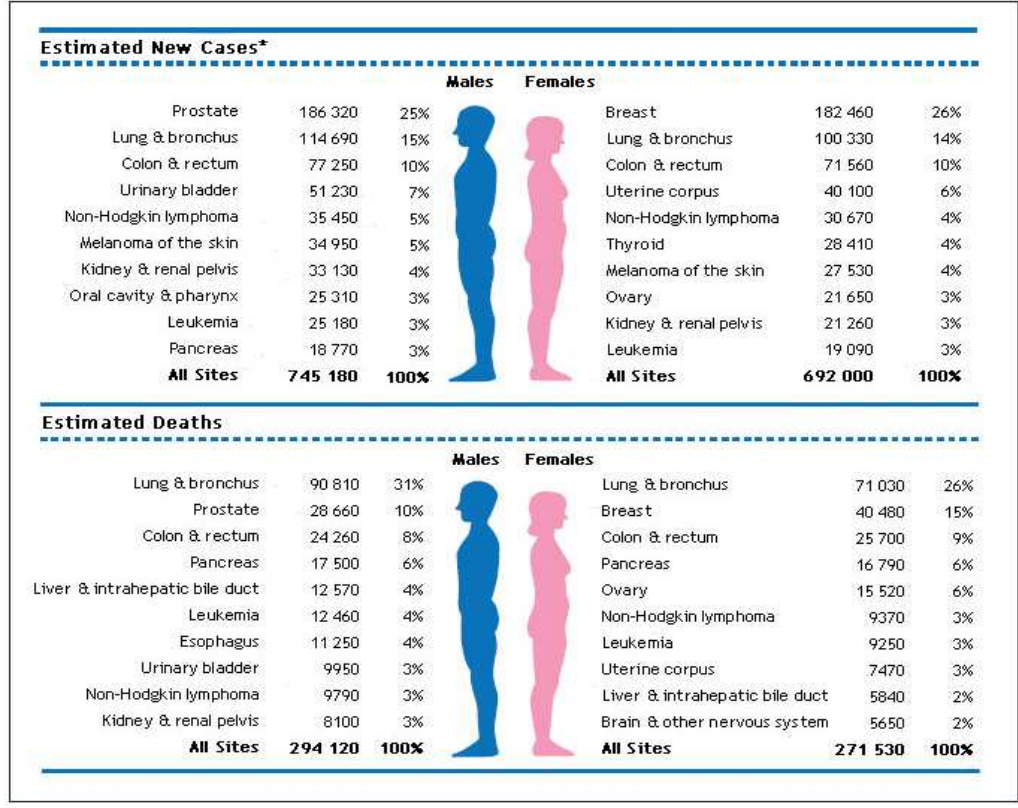
GENEL BİLGİLER

2.1. Karsinogenezis

Karsinogenezis, hücrenin büyümesi ve farklılaşması ile bunun kontrol edilmesi gibi birçok biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi temeline dayanmaktadır. Kanserin gelişimi sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellikler kazanır. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmalarına ve çevre dokuya yayılmalarına neden olur. Ayrıca, kendi çevrelerinden bağımsız olarak yaşamını devam ettirebilen bu hücreler, metastaz yapma özelliği sayesinde organizmanın organlarını hasara uğrattırır. Kanser hücreleri kaynaklandıkları normal hücrelere göre daha kısa zamanda ölmelerine rağmen yeni hücre oluşumunun çok hızlı olması nedeniyle hücreler devamlı birikir. Genetik anormallikler sonucunda gerçekleşen aşırı hücre birikimine ek olarak organizmanın kanser hücrelerini tanıma ve yok etmedeki başarısızlığı hücre ölümünü yavaşlatır ve sonuçta hücre yapım/yıkım dengesi bozulmuş olur. Hücre siklusu, apoptozis, DNA tamiri gibi anahtar hücresel mekanizmalardan sorumlu genlerde ve protoonkogen / tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen seri mutasyonların, malign fenotipin oluşumuna katkıda bulunduğu belirtilmektedir [2]. Tüm bunlara ek olarak büyüme faktörleri ve reseptörleri, transkripsiyon faktörleri, mitojenik aktivite gibi önemli hücresel sinyal iletim basamaklarında oluşan bozuklukların kanser oluşumunda ve ilerlemesinde kilit rollere sahip olduğu rapor edilmiştir [9].

2.2. Prostat Kanseri

Prostat kanseri, halen erkeklerde en sık tanı konulan ve artan insidansı ile beraber akciğerden sonra ikinci en sık ölümcül olan kanser tipidir [1]. Prostat spesifik antijenin (PSA) prostat kanseri tanısında kullanılmaya başlanmasından sonra prostat kanseri insidansında ciddi bir artış olmuştur [10]. PSA testinin yaygınlaşması ile lokal-bölgesel hastalık insidansı artarken metastatik hastalık insidansı azalmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yapılan bir çalışma sonucunda, 2008 yılı itibarıyla tahmin edilen prostat kanseri olgusunun 186.300 kişi (tüm kanser olgularının %25'i), ve ölüm olgusunun ise 90.810 kişi (tüm kanser ölüm olgularının %10'u) olduğu rapor edilmiştir (Şekil 2.1) [1].



*Excludes basal and squamous cell skin cancers and in situ carcinoma except urinary bladder.

Şekil 2.1. 2008 yılı itibariyle farklı tipteki kanser olgularının tahmini sayıları ve ölüm oranları [1].

Histolojik olarak latent form ve klinik form olmak üzere iki formu olan prostat kanseri, tek solit tümördür. Birinci gruptaki hastalık hayat boyu hiç tanı konmadan sessiz kalabilirken, ikinci gruptaki ise prostat dışına sıçrayarak yayılım gösterir ve ileri evre hastalık boyutuna ulaşabilmektedir. Latent formu 50 yaş üzerinde %30, 80 yaş üzerinde %60-70 oranında tespit edilebilir. Klinik formu ise ömür boyu her 6 bireyden birinde ortaya çıkar. Prostat kanseri etiolojisinin büyük bir oranının bilinmemesine rağmen prostat kanseri gelişiminde, ileri yaş, ırk, etnik ve çevresel özellikler ile genetik temel gibi birkaç risk faktörü tanımlanmıştır.

2.3. Prostat Kanseri Risk Faktörleri

2.3.1. Yaş

Prostat kanserinin görülme sıklığı yaşla birlikte belirgin olarak artmaktadır. Özellikle 50 yaşının üzerindeki erkeklerde hem görülme sıklığı hem de kanserden ölüm oranı yaşa bağlı olarak katlanarak artar. 39 yaş altında görülme oranı 1/10.000 iken, 40-59 yaşlar arasında 1/139 ve 60-79 yaşları arasında ise bu oran 1/8'dir [11].

2.3.2. Diyet

Diyetle yüksek oranda yağ alımının prostat kanseri insidansını arttırdığı düşünülmektedir. Bu hipoteze göre diyetle alınan fazla miktarda yağ, seks hormonlarının sentezini arttırmakta bu da prostat bezinde kanser riskini arttırmaktadır. Bu hipotez sadece yağlar için değil aynı zamanda, yağda eriyen vitaminler (A, D, K) ve eser elementler (çinko) için de geçerlidir. Ayrıca yüksek kalsiyum tüketiminin prostat kanseri riskinde artışla ilişkili olduğu bulunmuştur [12]. Likopen, selenyum ve E-vitaminin antioksidan etkileri sebebiyle kanserde potansiyel bir negatif faktör olduklarına dair çeşitli veriler mevcuttur [13].

2.3.3. Etnik Özellikler ve Çevresel Faktörler

İrklara göre prostat kanseri insidansları arasında büyük farklar mevcuttur. Klinik prostat kanseri insidansı uzakdoğulu erkeklerde en düşük, İskandinav erkeklerinde ise en yüksektir. Ayrıca, siyah derili erkeklerde prostat kanseri insidansının ve mortalitesinin beyazlara göre daha yüksek olduğu ve bunlarda metastatik hastalığın daha fazla olduğu bilinmektedir. Irklar arasında gözlenen bu değişikliğin nedeninin, androjen metabolizmasındaki farklılıklar ve diet/yaşam tarzı ile kuvvetlice ilişkili olduğu öne sürülmektedir [14].

2.3.4. Genetik Polimorfizm

Prostat kanseri riskinin ailevi olarak arttığı gösterilmiştir. Babalarında ya da erkek kardeşlerinde prostat kanseri saptanan erkelerin bu kansere yakalanma risklerinin normal popülasyona göre arttığı gösterilmiştir. Tüm prostat kanserlerinin %9'unda ve 55 yaşın altındaki vakaların %45 'inde yüksek olasılıklı otozomal dominant geçiş varlığı gösterilmiştir [15]. Prostat kanserinin transformasyonuna neden olabilecek bazı yüksek riskli genler tanımlanmıştır. Bu şüpheli genlere arasında; kromozom 1q24-25 üzerindeki HPC 1 [16], Xq27-28'de yer alan (X'e bağlı geçiş ile) HPC X [17], 17q21 üzerindeki BRCA 1 [18] ve 13q12'de yer alan BRCA 2 [19], 11p36 üzerindeki CAPB [20], 1q42.2-43 üzerinde yer alan PCAP [20], ve son dönemlerde 17p kromozomu üzerinde yer alan ELAC2/HPC2 [21] bulunmaktadır.

Genetik faktörler, prostat kanserinin %10'luk gibi oldukça küçük bir yüzdesinden sorumlu tutulmakta ve erken yaşta ortaya çıkan prostat kanseri ile ilişkilendirilmektedir. Buna karşılık kalıtsal olmayan %90'luk büyük oranın asıl sorumlusu ise, prostatın doğal seyri ile ilişkili olan kilit öneme sahip hücrel mekanizmalarda gerçekleşen mutasyonlardır. Bunlar, başlıca hücre büyümesi ve farklılaşmasının kontrolünü, apoptozisi, DNA tamirini ve tümör süpresyonunu düzenleyen mekanizmalara kadar geniş bir alanda etki göstermektedirler [2].

2.4. Prostat Kanserinin Oluşumunda ve Progresyonunda Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar

2.4.1. AR'nin Etkileri

AR, steroid ve tiroid hormon reseptörü geni süperailisinin üyesidir ve Xq11-12'de yer almaktadır. Bu nükleer reseptör, hormonu sitoplazmada bağlayıp nükleusa transloke eder. Nükleusta DNA bağlanması aşamasında dimerize olan hormon, androjene yanıt veren genin promoter bölgesine bağlanarak transkripsiyonel kompleks oluşturur. AR'lerin tümör progresyonuna etkisi üç farklı mekanizma ile özetlenebilmektedir:

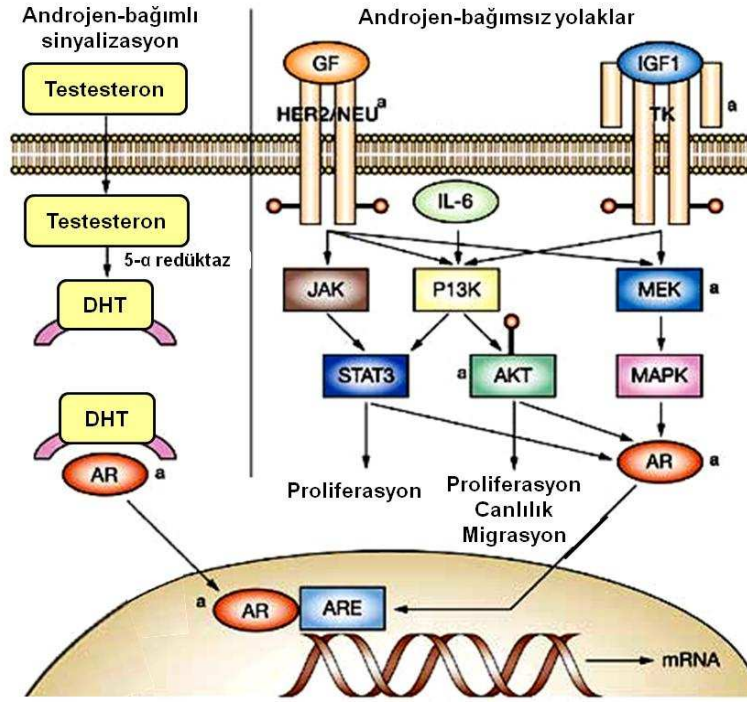
1- Reseptör ekspresyonu ve aktivasyonunda artış: Prostat kanserinin gelişmesi için AR aktivitesi gerekli olup hastalığın geç döneminde androjen ablasyonu (baskılama) tedavisi sonrası gen aktivasyonu için bir hedefdir. Androjen yokluğuna rağmen progresyon gösteren ileri evre prostat kanserlerinde AR dominant onkogen olarak etki etmektedir. Androjen seviyeleri kastre düzeyde olduğu için tümörlerin yaklaşık üçte birinde AR ekspresyonu, gen düzeyinde artmıştır. AR'nin aşırı ekspresyonu prostat kanserinin klinik süreci boyunca korunur ve en ileri evre androjen bağımsız hastalarda bile mevcuttur.

2- Nokta mutasyonlar: AR yoğunluğundaki artış, AR geninde bazı değişimlere yol açar. Bu değişimler arasında en çok rastlanılan nokta mutasyonlarıdır. Bu sayede AR, sadece androjen tarafından değil çok sayıda steroid tarafından aktive edilebilir hale gelir. Yapılan çalışmalar androjenlerin ortamda bulunmadıkları durumlarda estradiol, vitamin D, insulin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi non-androjenik faktörlerin de androjenik etkiyi başlattıklarını göstermektedir [22], [23]. AR nokta mutasyonları erken evre prostat kanserlerinde sık değildir, daha çok ileri evre olan metastatik olgularda %21 oranında saptanmıştır [3].

3- Ligand bağımsız aktivasyon: Büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri ile ilişkili olan moleküller, sitokinler, peptid hormonlar, nörotransmitterler ve interlökin- 6 (IL-6) gibi farklı bileşenler ligand bağımsız olarak AR'leri aktive edebilirler. Epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörü ile ilişkili olan insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2/neu) proto-onkogeninin mutasyonu, prostat kanserinde sık gözlenen mutasyonlardan birisidir. ErbB2 olarak da bilinen HER2/neu, androjene bağlı olmaksızın büyüme faktörleri tarafından aktive edilerek proliferatif etkileri oldukça kuvvetli üç önemli yolak olan sinyal iletim ve transkripsiyon aktivatörü-3 (STAT3), mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) ve Akt üzerinden hücre içindeki AR'yi uyarır. Aktive olan AR, DNA üzerindeki yanıt bölgesine bağlanır ve androjene bağlı genlerin transkripsiyonu gerçekleşir (Şekil 2.2).

Bunun yanı sıra IL-6 da, AR aktivitesinde rol oynayan en önemli non-steroidal düzenleyicilerden birisidir. Hücre proliferasyonu ve apoptozis üzerine çok sayıda etkisi olan IL-6'nın, prostat kanserli hastaların serumlarında yüksek düzeyde bulunduğu gösterilmiştir [24]. IL-6'nın androjensiz ortamlarda AR üzerindeki uyarıcı etkisi, androjenlerin oluşturdukları maksimum etkinin yaklaşık %50 kadarı gibi yüksek bir

boyuta ulaşabilir. Ayrıca ortamda androjen yoğunluğu düşük boyutlardayken AR üzerine uyarıcı etki IL-6 tarafından potansiyelize edilir. Bu sinerjik etkileşim androjenlerin dolaşımdaki varlığının devam ettiği olgularda klinik olarak büyük önem taşır.



Şekil 2.2. Prostat kanserinde AR sinyalizasyonu [25].

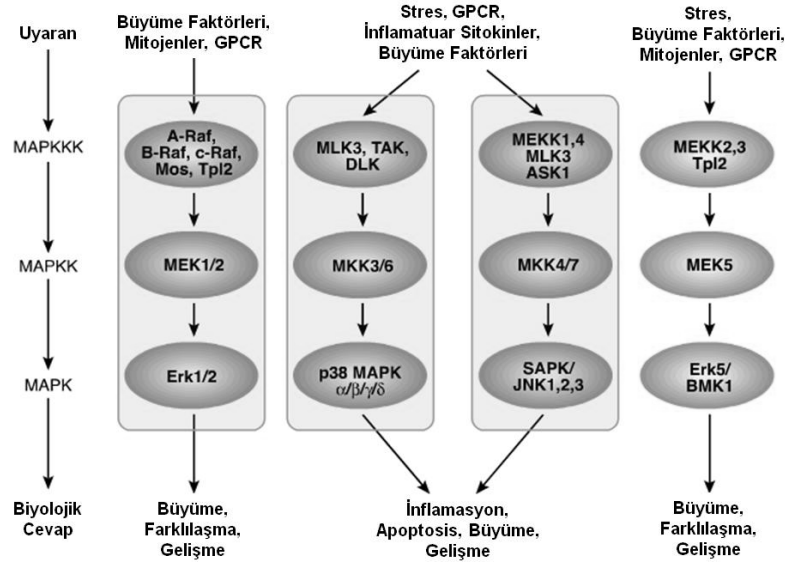
2.4.2. Androjenler ve Büyüme Faktörleri

Prostat dokusunun büyümesi, gelişmesi, fonksiyonel olabilmesi ve devamlılığının sürdürülmesi androjenlere, özellikle testesteron ve dihidrotestesterona (DHT) bağlıdır. Bu androjenlerin bulunmadığı durumlarda prostat dokusu apoptoziye girer ve belirgin atrofi gelişir.

EGF reseptörlerindeki aşırı ekspresyona ek olarak, transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α), keratinosit büyüme faktörü (KGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve IGF-1 ile bunların reseptörlerinin ekspresyonlarının da prostat kanserinde arttığı rapor edilmiştir [26]. Bu faktörlerin, hem normal hem de transforme prostat epitelyal hücrelerinde mitojenik ve antiapoptotik etkileri vardır. AR, büyütücü etkilerinin bir kısmını IGF-1 üzerinden yapmaktadır (Şekil 2.2). IGF bağlayıcı proteinler (IGF-BP3 gibi), IGF-1'in serumdaki miktarı üzerinde etkilidirler. Androjenler serumda IGF-BP3'ü azaltarak serumdaki serbest IGF-1 düzeyini artırırlar. Yapılan bir prospektif çalışma serumdaki IGF-1 miktarındaki 100 ng/ml'lik bir artışın prostat kanseri riskini 2 kat arttırdığını göstermiştir [27].

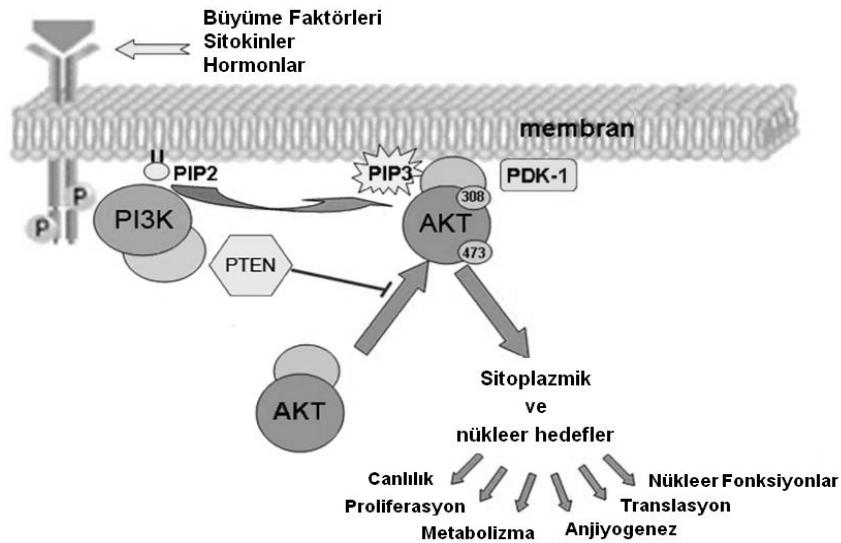
2.4.3. Proliferatif Hücre İçi Sinyal Yolakları

Prostat kanserinde büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna bağlı olarak hücre içi sinyalizasyonu da artar. Proliferatif hücre içi yolakları olan MAPK, fosfotidil inozitol-3 kinaz (PI3K) ve nükleer faktör-kappaB (NFkB), tümör hücresinin çoğalmasında merkezi öneme sahiptirler. Bu yolaklar, büyüme faktörlerinin reseptörlerine bağlanmasını takiben aktive olurlar ve DNA'ya direkt bağlanarak transkripsiyonu arttıran mediyatörlerin sentezine aracılık ederler. MAP kinaz yolu bir kinaz kaskadı olarak çalışır. Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAPK kinaz kinazın (MAPKKK) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPK kinaz (MAPKK) (MEK olarak da isimlendirilir) ve MAPK aktive olur. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin biyolojik cevabı oluşur (Şekil 2.3). Ras pro-onkogeni, kuvvetli proliferatif olması nedeniyle oldukça önemlidir. Ancak kanserli bir hücrede Ras'da meydana gelen nokta mutasyonu (prostat kanserinde 12. ve 13. kodonlarda) sonucunda intrinsik guanozin trifosfataz (GTPaz) aktivitesini kaybederek Ras proteini sürekli aktif formda kalır ve böylelikle kontrolsüz hücre çoğalmasına aracılık eder. Ras mutasyonunun, tüm insan kanser olgularının yaklaşık %30'unda, prostat kanseri olgularının ise %13'ünde saptandığı rapor edilmiştir [28]. Ayrıca androjen-bağımlı prostat kanseri hücresi olan lenf nodu metastazlı prostat kanseri (LNCaP) hücrelerinde yapılan bir çalışmada Ras onkogeninin, prostat kanseri hücrelerini androjen-bağımlı formdan çok daha agresif olan androjen-bağımsız forma çevirerek tabloyu daha da ağırlaştırdığı gösterilmiştir [29]. Ras onkogenine ek olarak, Raf/MEK/Erkstraselüler sinyal regülasyonlu kinaz (ERK) yolağının da prostat kanserinde aşırı derecede eksprese olduğu, hatta bu aktivasyonun Gleason skor ile uyumlu olarak arttığı saptanmıştır [30].



Şekil 2.3. MAPK sinyal yolaklarının aktivasyonu.

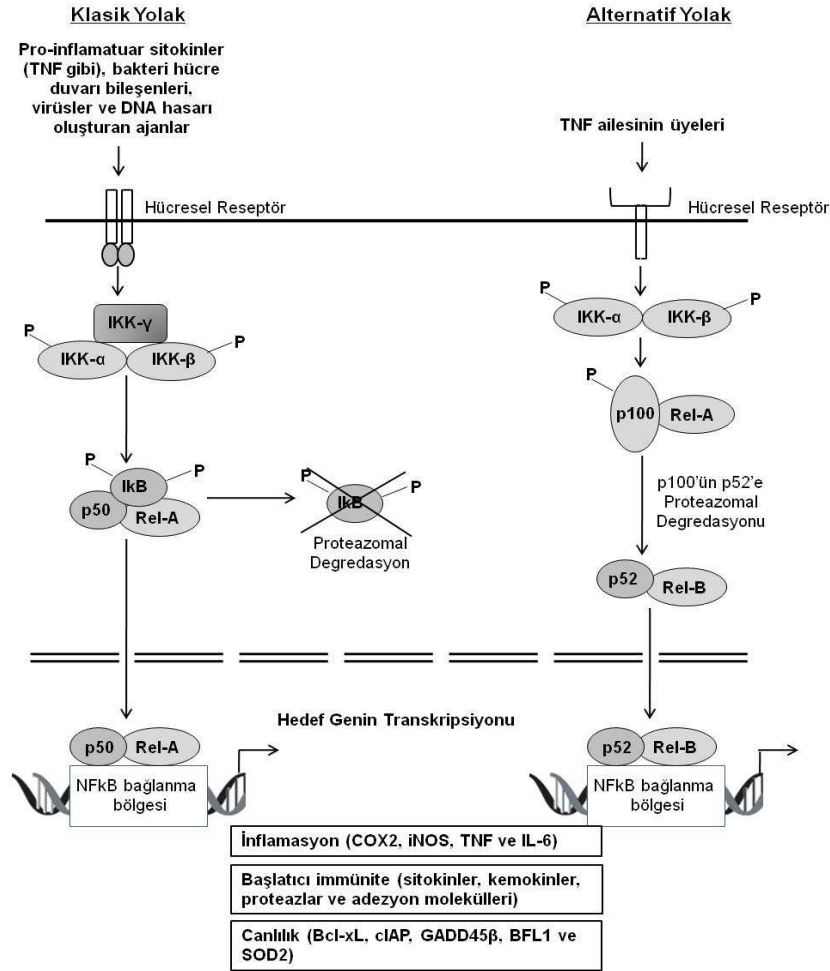
Büyüme ve farklılaşma sinyallerinin iletiminden sorumlu olan bir başka mekanizma ise PI3K/Protein kinaz-B (PKB)/Akt yolağıdır. Reseptörün uyarılmasından sonra PI3K, hücre membranında inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Oluşan fosfotidilinozitol trifosfat (PIP₃), PIP₃ bağımlı kinazları (PDK) aktive ederek, PKB ve Akt üzerinden hücre canlılığını artıran buna karşılık hücre ölümünü azaltan proteinlerin aktivasyonuna neden olur (Şekil 2.4). Akt; tumor baskılayıcı gen olan p53 ile önemli pro-apoptotik proteinler olan Bad ve caspase-9'u inhibe ederek programlı hücre ölümünü (apoptozisi) baskılaması, ayrıca anti-apoptotik olan Bcl-2'yi ve IκB kinaz (IKK) üzerinden NFκB yolağını aktive ederek hücre canlılığını arttırması nedeniyle kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına aracılık eder. PI3K/PKB/Akt sinyal yolağının en önemli inhibitörü olan PTEN, içerdiği fosfataz aktivitesi nedeniyle PI3K'ı defosforile ederek fosfotidilinozitol difosfat oluşunu sağlar, böylece PI3K'in, Akt üzerindeki aktivatör etkisi ortadan kalkmış olur. PTEN, bir tümör supressör genidir ve p53, Ras gibi mutasyonu kanserde oldukça sık rastlanılır [31]. PTEN geninde meydana gelen delesyonların ve mutasyonların prostat, meme, endometriyum ve over gibi birçok kanserle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak bunların arasında en çok prostat kanserinin prognozu ile ilişkilidir. Metastatik prostat kanser olgularının yaklaşık %60'ında PTEN kaybı saptanmıştır [4].



Şekil 2.4. PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonu ve regülasyonu.

Hücre çoğalmasını indükleyen diğer bir yolak olan NFκB de, MAK ve PI3K/PKB/Akt yolakları gibi karsinogenez ile oldukça yakından ilişkilidir. NFκB, siklin D1'i uyararak hücre siklusunu, c-myc'yi uyararak transkripsiyonu, Bcl-2'yi uyararak anti-apoptotik aktiviteyi, IL-6'yı uyararak inflamasyonu, VEGF ve siklo-oksijenaz-2 (COX-2)'yi uyararak anjiyogenezi ve son olarak da matriks metallo proteinaz-9'u (MMP9) uyararak invazyonu ve metastazı kanser hücrelerinde indükler (Şekil 2.5).

Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi pro-inflamatuvar sitokinler, bakteriyel hücre duvarı komponentleri, virüsler ve DNA hasarına neden olan ajanlar tarafından aktive olan NF κ B yolağının transkribe ettiği IL-1 sitokini, tümör hücreleri üzerindeki reseptörüne bağlanarak yine NF κ B üzerinden kanser hücresinde etkilerini gösterir. Bu etkiler sonucunda da yukarıda bahsedildiği gibi kanser hücreleri proliferasyon olurlar [32]. Prostat kanseri hücrelerinde NF κ B'nin inhibitörü olan I κ B kompleksinin aktivitesinin aşırı derecede arttığı ve böylelikle NF κ B'nin I κ B'den ayrılarak nükleusa transloke olarak ilgili genlerin transkripsiyonunu aşırı derecede gerçekleştirdiği gösterilmiştir [33]. Ayrıca, NF κ B'nin yine prostat kanseri hücrelerinde AR'nin mRNA ve protein düzeylerini ve bunun sonucunda da proliferasyonu da arttırdığı saptanmıştır. Dolayısıyla NF κ B inhibitörlerinin, androjen yoksunluk tedavisine dirençli olan prostat kanseri hastalarının tedavisinde alternatif bir terapötik ajan olarak kullanılabilirliği ileri sürülmektedir [34].



Şekil 2.5. NF κ B/I κ B sinyal yollarının aktivasyonu.

2.4.4. Programlı Hücre Ölümü (Apoptozis)

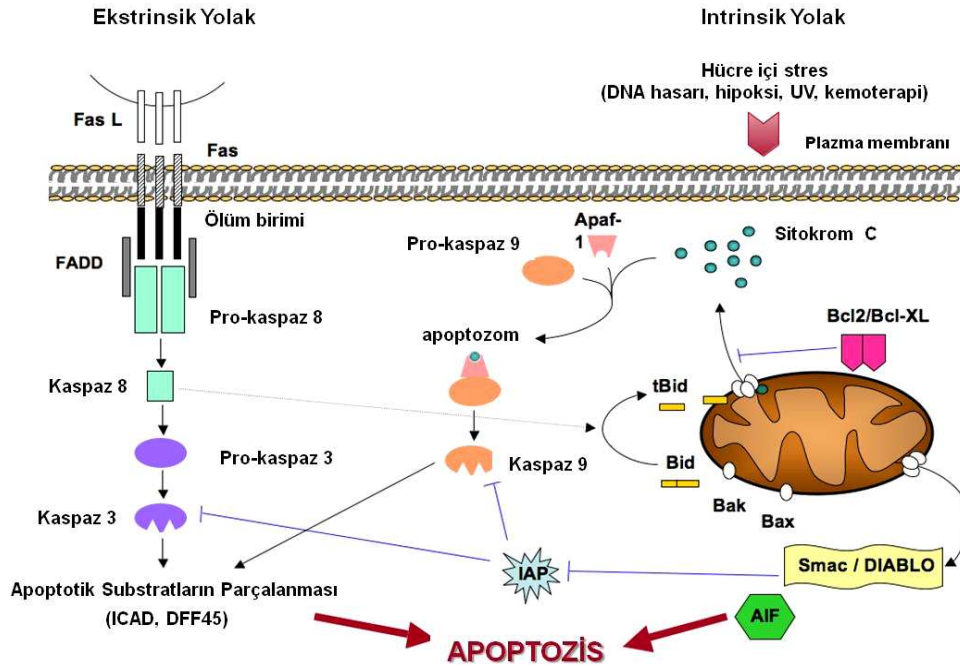
Apoptozis, hem fizyolojik hem de patolojik olarak istenmeyen, hasar görmüş ya da potansiyel olarak neoplastik hücrelerin uzaklaştırılmasında başvurulan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Doku homeostazisi, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır ve bu dengenin bozulması kanser başta olmak üzere birçok önemli hastalığın patogeneğinde rol aldığı gösterilmiştir [35]. Artmış proliferasyon ve azalmış apoptozis karsinogeneze aracılık etmektedir [36], [37]. Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır. Apoptozisin kontrolünde, Bcl-2 ailesi ve kaspazlar önemli roller oynarlar. Bcl-2 ailesinin bir kısım üyesi apoptozisi indüklerken (Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs), diğer bir kısım üyesi ise inhibe eder (Bcl-2, Bcl-Xl). Hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölâtif oranına bağlıdır. Bunlar arasından da en çok apoptotik değere sahip olanı Bcl-2/Bax'dir. Bu ikisinin birbirine oranı, malignansilerde prognostik bir değer taşır [38]. Kaspazlar ise birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskad oluştururlar. Başlatıcı kaspazlar olan kaspaz 2, 8, 9, 10, apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini alıp efektör kaspazlara naklederken, efektör kaspazlar olan kaspaz 3, 6, 7 de ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA fragmente edici faktör (DFF), poli-adenozin difosfat riboz-polimeraz (PARP), endonükleaz G) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar [39].

Apoptozis, intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki ana mekanizma aracılığıyla meydana gelir (Şekil 2.6);

(i) Ekstrinsik yolda apoptozis, TNF, Fas, koloni uyarıcı faktör (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), IGF, IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler gibi hücre dışı uyarılar tarafından aktive edilir. Bu ligandlar, membranda bulunan hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1) ile etkileşime girerek ekstrinsik apoptotik yolak indüklenir. Bu etkileşim sonucunda, TNFR-1'in sitoplazmik kısmında yer alan TNFR-1 ilişkili ölüm birimleri (TRADD) ve Fas ilişkili ölüm birimleri (FADD) aktifleşir. Bu aktivasyon da önce kaspaz-8'i sonra da kaspaz-3'ü aktifleştirir ve sonuçta aktif kaspaz-3, endonükleaz aktivitesine sahip olan DFF'i parçalayarak DNA'da 50-300 kbp'lik parçalar oluşturur. DFF aracılığıyla fragmentasyona uğrayan DNA'yı içeren hücre ise, geri dönüşümsüz olarak apoptoza gider [40].

(ii) Intrinsik yolda ise apoptozis, radyasyon, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış gibi hücre içi uyarılar tarafından aktive edilir. Ayrıca hipertermi, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de intrinsik yolak üzerinden apoptozi uyarabilmektedir. Apoptozisin bu mekanizması, mitokondriye bağımlıdır. Apoptotik hücre içi sinyalin alınmasından sonra Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyeleri olan Bax ve Bad proteinleri mitokondri membranında oligomerize

olarak, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltır. Böylece mitokondriden; sitokrom c, sekonder mitokondri türevli kaspazlar/direkt apoptozis inhibitörünü bağlayıcı protein (Smac/DIABLO) ve apoptozis indükleyici faktör (AIF) gibi mediyatörler salınır. AIF, direkt olarak nükleusa gider ve buradaki endonükleaz G'yi aktive ederek DNA'da fragmantasyona neden olur. Smac/DIABLO, apoptozis inhibitör proteinine (IAP) bağlanarak kaspaz-9'un inaktive olmasını engeller. Sitokrom c'nin ise mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi, apoptotik süreçte geri dönülemez noktayı gösterir [41]. Sitokrom c önce bir sitoplazma proteini olan apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)'e daha sonra ise prokaspaz-9'a bağlanarak beraberce apoptozom denilen kompleksi oluştururlar. Oluşan kompleks önce kaspaz-9'u daha sonra da efektör kaspazlar olan sırasıyla kaspaz-7, kaspaz-3 ve kaspaz-6'yı aktive ederek, Lamin B, PARP ve endonükleaz G enzimlerini parçalar ve onları aktifleştirir. Sonuçta kromatin kondensasyonu ve DNA'nın fragmanlara ayrılması meydana gelerek hücre apoptoza gider [42].



Şekil 2.6. Hücre içi ekstrinsik ve intrinsik apoptotik yollar.

Prostat kanserinde oldukça sık rastlanılan PTEN mutasyonu sonucunda aşırı derecede aktive olan Akt, kuvvetli bir anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ve Bcl-xL'nin etkilerinin artmasına, intrinsik yolun önemli bileşeni olan kaspaz-9'un da inhibe olmasına neden olur. Intrinsik yoldaki etkilerine ilaveten PTEN normal koşullarda hücrelerin, membranda bulunan ölüm reseptörlerine olan hassasiyetlerini artırarak ekstrinsik apoptoza gitmesine de aracılık eder. Ayrıca prostat kanserinde sık gözlenen diğer bir durum olan p53 mutasyonu sonucunda da, Bcl-2 ailesinin önemli pro-apoptotik

proteinleri olan Bax ve Bad mitokondri membranında oligomerize olamazlar ve mitokondriden sitokrom c salınmaz. Yapılan çalışmalar, apoptozisin kontrolünde kilit rol oynayan Bcl-2'nin aşırı eksprese edilmesi sonucunda androjen bağımlı olan prostat kanser hücrelerinin, agresif tip olan androjen bağımsız forma dönüştüğünü ve bunun da kanserin prognozunu daha da kötüleştirdiğini göstermiştir [43], [44]. Bcl-2 aşırı ekspresyonunun erken evre tümörlerde de görülebilmesine karşın ileri evre prostat kanserlerinde ekspresyon artışı çok daha sık saptanır [43]. Genel olarak insan tümörlerinde kaspazlarda mutasyon çok sık rastlanılan bir durum değildir, ancak aktivite kaybı oldukça sık rastlanılır. Prostat kanseri hücrelerinde kaspaz-1, -3 ve -9 ile yapılan bir çalışmada, kaspaz-9'un aksine özellikle kaspaz-1 ve -3 aktivitelerinin anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir [45].

2.4.5. Prostat Kanserinde En Sık Saptanan Genetik Değişiklikler

Prostat kanserinin progresyonu ile ilişkili olarak en sık saptanan genetik değişiklikleri;

Telomeraz: Normal hücrel yaşlanma kromozomların uçlarındaki telomer bölgelerinden genetik materyal kaybıyla karakterizedir. Ana hücreler (stem cell) telomer kısalmasını telomeraz enzimi ile önler ki bu enzim bir revers transkriptaz olup kayıp telomerik üniten yerini alır. Prostat kanserlerinin çoğunun telomeraz eksprese ettiği rapor edilmiştir [46].

Glutasyon-S-transferaz-pi (GST-pi): Reaktif oksijen ürünlerini (örn. Serbest radikaller) inaktive eden koruyucu bir enzimdir. Bu enzim ekspresyonunun tüm prostat kanseri vakalarında azaldığı rapor edilmiştir [47].

PTEN / Akt: 10q kromozomunda heterozigozitenin kaybı prostat kanserinde sık görülen genetik bir değişikliktir. PTEN tümör süpresör geni kromozom 10q23'te tanımlanmıştır. Hem lokalize hem de metastatik prostat kanserlerinde PTEN değişiklikleri saptanmıştır [48].

p27: kromozom 12p12 de lokalize tümör süpresör genidir. Radikal prostatektomili hastalarda p27 ekspresyon kaybı ile artmış biyokimyasal rekürrens arasında ilişki saptanmıştır [49].

myc: Prostat kanserindeki en sık kromozomal değişiklik kromozom 8q'nun uzun kolunun kazanılmasıdır. 8q üzerindeki genlerdeki kazanım veya artış metastaz riskini arttırmaktadır. 8q 24 üzerindeki myc geni muhtemelen prostat kanseri progresyonundaki genlerden biridir Myc geni lokal ileri ve metastatik tümörlerde büyür ve aşırı salınır [50].

Bcl-2: Kanser artmış hücrel çoğalma ve azalmış hücre ölümü (apoptozis) ile karakterizedir. Bcl-2 apoptozisi önleyen bir onkogendir. Prostat hücrelerinin önemli bir yüzdesinde özellikle androjen bağımsız olanlarda artmış Bcl-2 ekspresyonu saptanmıştır [51].

p53: Önemli tümör süpresör genlerden biridir. p53 kaybı veya mutasyonu lokal ileri ve metastatik tümörlerde gösterilmiştir. p53 mutasyonu radikal prostatektomi ve radyoterapide kötü prognozla ilişkilidir [52].

VEGF: Tümör hücresi normal durumda 1 cm²'lik alan kadar çoğalabilir. Daha geniş yayılımı için kan ile beslenmeye yani damarlanmaya gereksinim duyar. VEGF, tümör anjiyogenezinde en aktif rol oynayan faktördür. VEGF prostat kanserlilerin büyük kısmından salınır ve artmış salınım klinik agresifliği ile korelasyon gösterir [53].

MMP: Tümör hücrelerinin invazyonu ve metastazı için damarlanmadan sonra ekstraselüler matriksin yıkılması önemlidir. Bu noktada da MMP'ler rol oynamaktadır. Özellikle MMP-2 ve -9'un prostat kanserinde 7 kat fazla aktive olduğu saptanmıştır [54].

E-Kaderin: Hücrelerarası adezyon proteinlerinden birisidir. Bu protein, 16q23 kromozomunda yer alır ki prostat kanserinde bu bölgenin kaybı rapor edilmiştir. E-kaderin salınımı, prostat kanserlerinin büyük kısmında ve özellikle kötü diferansiye tümörlerde azalmıştır [55].

2.5. PKC

PKC olarak adlandırılan enzim ailesi ilk olarak 1977 yılında Nishizuka ve arkadaşları tarafından sıgır serebellumunda siklik nükleotidden bağımsız protein kinazlar olarak tanımlanmıştır [56]. Aynı araştırmacılar 1984 yılında daha ayrıntılı olarak bu enzimlerin Ca⁺², fosfolipid ve DAG ile aktive olduğunu ve serin rezidülerinden histon proteinlerini fosforladığını bulmuşlardır [57]. 1982 yılında Castagna ve arkadaşları da bu aktivatörlere ek olarak PKC'nin, bir tümör promotörü olan forbol esterlerin hücre içi reseptörü olduğunu göstermişlerdir [58]. Serin/treonin protein kinaz ailesi olan PKC'nin şu ana kadar tanımlanmış 12 üyesi bulunmaktadır (Tablo 2.1). Bunlar da primer yapılarındaki ve kofaktör ile regülasyonlarındaki farklılıkları temel alındığında kendi aralarında 3 temel gruba ayrılırlar [59];

Klasik grup (cPKC): PKC- α , - β I, - β II ve - γ izomerlerinden oluşur ve hem Ca⁺² ile hem de DAG ile aktive olurlar. Ayrıca aktivasyon için gerekli olan DAG ihtiyacını elimine eden ve Ca⁺² konsantrasyonunu azaltan forbol ester miristat asetat (PMA) da, bu grup izoenzimlere bağlanabilmektedir.

Yeni grup (nPKC): PKC- δ , - ϵ , - η ve - θ izomerlerinden oluşur ve aktivasyonları Ca⁺²'dan bağımsız, DAG'a bağımlıdır. Ayrıca klasik grup gibi, PMA ile aktive olabilirler.

Atipik grup (aPKC): PKC- ζ , - ι , - λ ve - μ izomerlerinden oluşur ve ne Ca⁺² ile ne de DAG ile aktive olurlar.

Tablo 2.1. PKC izoformlarının aminoasit sayıları ve molekül ağırlıkları [60].

İzoform	Aminoasit sayısı	Moleküler Ağırlık (kDa)
PKC α	672	76.704
PKC β I	671	76.683
PKC β II	673	76.806
PKC γ	697	78.268
PKC δ	674	77.458
PKC ϵ	737	83.492
PKC η	683	77.884
PKC θ	707	81.479
PKC ζ	592	67.605
PKC λ	586	67.200
PKC ι	587	68.600
PKC μ	912	120.000

2.5.1. PKC'nin Yapısı

PKC izoenzimleri, N-terminalinde bulunan regülatör birim (20-40 kDa) ile C-terminalinde bulunan katalitik birimden (45 kDa) oluşurlar. Yapılarında regülatör olarak C1 ve C2, katalitik olarak C3 ve C4 birimleri olmak üzere 4 konservatif bölge ve V1-V5 birimleri olmak üzere 5 değişken bölge bulunur. Her bir birimin fonksiyonel bir önemi olduğu biyokimyasal ve mutasyonel analizlerle kanıtlanmıştır [61].

C1 Birimi: cPKC'ler ve nPKC'ler, C1A ve C1B olmak üzere iki tane tekrarlı çinko parmağı motifini içeren C1 birimini bulundurlar. Bu tekrarlı motiflerin özelliği sistein ve histidin aminoasitlerince zengin rezidüye sahip olması (H-X₁₂-C-X₂-C-X_{13/14}-C-X₂-C-X₄-H-X₂-C-X₇-C) ve iki Zn⁺² iyonunun koordinasyonundan sorumlu olmasıdır. Yapılan mutasyonel analizler, C1 biriminin forbol esterler için bir bağlanma bölgesi olduğunu kanıtlamıştır. Çünkü bu birimin eksikliği söz konusu olduğunda forbol esterlere karşı herhangi bir yanıt gözlenmemiştir. PKC'nin diğer iki grubunun aksine aPKC'lerde ise, C1 birimi sadece bir tane çinko parmağı motifine sahiptir. Ancak buna rağmen aPKC'lerde forbol estere karşı bir yanıt gözlenmemiştir. Yapılan ileri mutasyonel çalışmalarda ise, C1A ve C1B motiflerinin birbirini ile aynı olmadığı kanıtlanmıştır. Şöyle ki; PKC δ 'nın C1A motifindeki prolin rezidülerinde meydana gelen mutasyonun, az oranda forbol estere karşı yanıtızsızlığa neden olurken, aynı orandaki mutasyonun C1B motifinde gerçekleşmesi sonucunda ise bu yanıtızsızlığın 125 kat arttığı gösterilmiştir. aPKC'lerdeki C1 birimi ise, C1A'ya kıyasla C1B ile daha fazla homolojiye sahiptir [62].

C2 Birimi: C2 birimi, cPKC'lerde C1 birimini C terminal yönünde, nPKC'lerde ve aPKC'lerde ise N terminali yönünde takip eden bölgede bulunur. C2 birimi, Ca⁺² için bağlama bölgesi, ayrıca asidik fosfolipidler için de tanıma bölgesi olarak görev yapar. Ancak nPKC'lerin ve aPKC'lerin aktivasyonları Ca⁺²'dan bağımsız olduğu için bunlardaki C2 birimleri Ca⁺² ile etkileşime girecek fonksiyonel gruplara sahip değildirler. PKC'ler içerisinde yapısı halen tam anlaşılamamış olan aPKC üyelerinde

buna ek olarak C2 birimlerindeki diğer anahtar fonksiyonel gruplar da mevcut değildir [63].

C3 ve C4 Birimi: Katalitik fonksiyona sahip olan bu birimlerden C3, adenozin trifosfat (ATP) için; C4 ise substrat için bağlama lopları içerir [64].

V5 Birimi: 5 farklı değişken bölge içerisinde V5, fonksiyonel açıdan diğerlerinden öne çıkmaktadır. Bu birim, 50 aminoasit kadar kısa bir dizilim olmasına rağmen, PKC'lerin fosforilasyonunun düzenlenmesinde kilit bir role sahiptir [65].

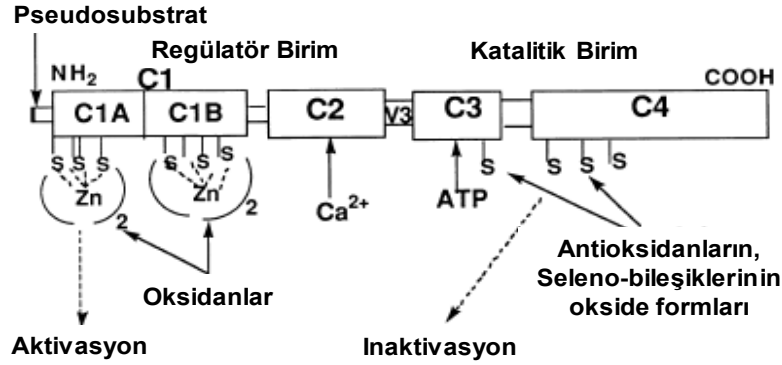
2.5.2. PKC'nin Fonksiyonları

PKC ailesinin üyeleri, hücre büyümesi ve farklılaşması, mitojenik aktivite, hücre-hücre interaksiyonu, immun cevap, transkripsiyonun kontrolü, sekresyon, sinaptik iletim ve ilaç direnci gibi birçok hücrel mekanizmalarda kilit rollere sahiptir. Ancak son yıllarda bütün bunlara ek olarak, apoptoziste ve kanserdeki önemli rolleri oldukça öne çıkmıştır [5]. PKC, substrat proteinlerinin Ser/Thr rezidülerinden fosforilasyonunu gerçekleştirir. PKC'nin karakteristik substratı, hücre mobilitesi, sekresyon, membran transportu, hücre siklusunun regülasyonu gibi önemli fizyolojik olaylarda rol oynayan miristollenmiş alanından zengin C-kinaz substratı (MARCKS) protein ailesidir. Bu ailenin üyeleri, aktin iskeletinin değişimi ve yeniden yapılanmasıyla ilişkilidir. Yapılan birçok farklı çalışmalarla şu ana kadar PKC'nin yaklaşık 190 substratının olduğu gösterilmiştir. Bunlardan bazıları; Bcl-2 [66], siklin active edici kinaz (CAK) [67], DNA topoizomeraz-I [68], endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) [69], MAPK [70], MEK/ERK [71], p53 [72], Raf-1 [73], STAT1 [74] dır. PKC'nin tüm üyeleri aynı yönde hücrel etkilere sahip olmayıp, izozimlerine göre değişmektedir. Bu değişiklikler o kadar farklılık göstermektedir ki, tam ters etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Proapoptotik özelliği ile öne çıkan PKC δ ve onkojenik olan PKC ϵ , bu konuda verilecek en güzel örnektir.

2.5.3. PKC'nin Sinyalizasyonu ve Oksidatif Stres

Hücreler ve dokular, rutin olarak ya ekzojen olarak ya da endojen olarak farklı oksidan ajanlara maruz kalırlar. Bilindiği üzere, oluşan oksidatif stres büyümenin kontrolü ile ilişkili olan sinyal yollarının aktivitesini arttırmaktadır. Oksidatif stres; önce, büyüme reseptörlerinin fosforilasyonunu, sonra ise fosfolipaz A2 (PLA2), PLD ve PLC gibi reseptör ile kontrol edilen enzimlerin aktivitesini artırır. Bu reaksiyonlardan türeyen lipid yapıdaki ikinci mesajcıların (araşidonik asit, fosfatidik asit ve DAG), başta protein kinazlar olmak üzere bazı sinyal moleküllerinin upstream aktivatörü olduğu bilinmektedir. Oksidan ajanlara olan maruziyet, PKC aktivitesinin artmasına neden olur. PKC'nin oksidatif koşulların değişmesine olan hassasiyetinin nedeni ise, yapısından kaynaklanıyor. Çünkü PKC, antioksidanlar için olduğu gibi oksidanlar için de direkt olarak bağlayıcı bölgelere sahiptir. PKC'nin hem katalitik hem de regülatör birimleri, redoks kontrolünün sağlanmasında hedef olan sistince zengin bölümler içerir (Şekil 2.7). Son zamanlarda, belirli miktardaki oksidanların enzimin regülatör birimi için önemli olan sistin rezidüleri ile reaksiyona girerek enzimi aktive, daha yüksek

konsantrasyonlardaki oksidanların ise katalitik birimdeki sistein rezidüleri ile etkileşime girerek enzimi inaktive ettiği yönünde kuvvetli deliller mevcuttur [7].



Şekil 2.7. PKC'nin katalitik ve regülator alt birimleri içerisinde bulunan oksidatif hassasiyete sahip kısımlar [7].

2.5.4. PKC'nin Kansere Progresyonuna Olan Etkileri

Bilindiği üzere kanserin gelişmesinde, önce Ras onkojeni gibi bir proto-onkojenin mutasyonuna neden olan başlatıcı bir ajan, daha sonra ise mutajenik bir etkiye sahip olmayan ilerletici bir kimyasal ajana olan uzamış maruziyet gereklidir. İşte bu söz edilen ilerletici ajanın, PKC'nin spesifik aktivatörü olarak tanımlanan PMA olduğu gösterilmiştir [58]. PMA, yüksek afinite ile PKC'nin DAG-bağlayıcı bölgesine bağlanarak PKC'nin aktivasyonunun uzamasına, ancak en sonunda da enzimin baskılanmasına neden olur. Ancak, tümörün gelişmesinin ve ilerlemesinin PKC izoenzimlerinin aktivasyonundan mı yoksa enzimin kronik aktivasyonu sonucu inhibisyonundan mı kaynaklandığı halen kesin olarak bilinmemektedir.

Karsinogenezdeki etkileri birbirinden oldukça farklı olan PKC izozimlerinin, bir kısmı aşırı derecede eksprese olurken, diğer bir kısmı inhibe olmaktadır. Kansere progresyonu süresince ekspresyonları değişen PKC izozimlerinden en sık bilinenleri α , β , δ ve ϵ 'dir. Immunohistokimyasal çalışmalar, PKC α 'nın aşırı ekspresyonunun mesane, prostat ve endometriyal kanserlerde olduğunu gösterirken, aynı izozimin aktivitesinin meme, kolon ve hepatoselüler kanserlerde azaldığı göstermiştir. PKC β 'nin ekspresyonu, kolon ve prostat kanserlerinde artarken, mesane kanserinde ise azaldığı belirtilmiştir. Benzer olarak PKC δ 'nin aktivitesi de, ya hepatoselüler kanserde olduğu gibi artabilir veya mesane kanserinde olduğu gibi azalabilir [5].

Prostat kanserinde, PKC'nin 12 izozimine ait ekspresyonların karşılaştırılması sonucunda α , β , ϵ ve η izozimlerinin benign prostat hiperplazisine (BPH) kıyaslandığında prostat kanserinde anlamlı derecede yükseldiği saptandı. Ancak bu izozimler arasında PKC ϵ 'nin diğerlerinden çok daha fazla oranda kanserde arttığı gözlemlendi. Bu nedenle prostat kanserinin tanısında PKC ϵ güvenilir bir marker olarak kullanılabilir. PKC α 'nın aktivitesinde ne benign ne de malign dokuda herhangi belirgin

bir değişiklik saptanmazken, PKC β 'ninki ise kanserli dokunun tersine benign dokuda artmıştır. PKC ϵ ise hiçbir benign dokuda eksprese olmazken kanserli dokuların hepsinde aşırı derecede eksprese olduğu saptandı. PKC ϵ 'e benzer olarak PKC ζ 'nin ekspresyonunun da kontrol ve benign dokuya kıyasla kanserde anlamlı olarak arttığı gösterildi [75].

PKC izozimlerinin arasında PKC ϵ ve PKC δ , karsinogenezdeki birbirine zıt etkilere sahip olmaları nedeniyle son zamanlarda oldukęa ne çıkmaktadır. Prostat kanserinin de dahil olduğu birçok kanser tipinde, apoptozisi indükleyen ve büyümeyi inhibe eden bir protein olan PKC δ 'nin baskılandığı, buna karşılık mitojenik özelliğinden dolayı kuvvetli onkojenik olan PKC ϵ ise aşırı derecede eksprese olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [76], [77].

2.6. PKC δ

PKC δ , yeni PKC alt ailesinin bir üyesidir ve Ca⁺²'dan bağımsız olarak DAG/forbol ester tarafından aktive edilir. Aktivasyonunu takiben PKC δ , ubiquitin-proteozom sistemi aracılığıyla proteolitik olarak parçalanarak veya down regülasyona uğrayarak inaktive olur. PKC'nin, hücre büyümesinin ve apoptozisin kontrolünde kritik bir role sahip olduğu bilinmektedir [78]. PKC δ 'nin kaybı, fibroblastlarda hücrenin transformasyonuna neden olurken aşırı ekspresyonu da hücre siklusunun G2/M fazında durmasıyla sonuçlanır.

2.6.1. PKC δ 'nin Apoptozis zerindeki Etkileri

Hücre apoptozisinin kontrolünde PKC ailesinin farklı izoformlarının rolleri birçok farklı hücre tipinde geniş bir şekilde araştırılmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre PKC α [79], β , ϵ , ζ [80] ve ι 'nin [81] anti-apoptotik etkiler ve canlılığın idamesi ile ilişkili olmasına karşılık, başta PKC δ [82] olmak üzere θ [83] ve μ 'nun [84] ise pro-apoptotik ve büyümeyi inhibe edici yönde etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. PKC δ 'nin aktivasyonu ve translokasyonu, farklı hücre sistemlerinde farklı apoptotik uyarılar tarafından indüklenir. Bu uyarılar, ölüm reseptörleri (Fas, TNF- α), radyasyon (ultraviyole (UV) ve γ), kemoterapötik ilaçlar (sisplatin, etoposid gibi), oksidatif stres (hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi), seramid, PMA, hiperglisemi ve IL-1 β gibi çok farklı eşittedir. PKC δ bu apoptotik uyarılar tarafından aktive olurken, bunların ortadan kalkmasıyla da inhibe olur [85, 86]. Rat epidermal hücre dizilerinde, PKC δ 'nin UV radyasyonu ile uyarılması sonucunda membrana transloke olduğu [87] tespit edildi. Ayrıca apoptozis, insan lösemik lenfoma hücrelerinde (U937) doku plazminojen aktivatörü (TPA) ve oksidatif stresle [85], rat keratinositlerinde TPA ile [88] ve insan keratinositlerinde UV radyasyon ile [89] stimüle edildiğinde, PKC δ 'nin mitokondriye transloke olduğu saptandı. PKC δ , membran ve mitokondriden başka çekirdeğe, golgiye ve endoplazmik retikulum (ER) gibi diğer organellere de transloke olabilir. İnsan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7), γ -radyasyonuna olan maruziyet sonucunda PKC δ 'nin çekirdeğe [90], insan epitelyal kanser hücresinde (HeLa) seramid ile uyarım sonucunda golgiye [91], sinir hücrelerinde ise sindbis virüsü ile uyarım sonucunda da ER'e [92]

yöneldiği gösterildi. Bu şekilde hücrenin spesifik kısımlarına PKC δ 'nın translokasyonu, PKC δ 'nın bu bölgelerdeki belirli proteinler ile etkileşime girmesi ve spesifik substratların fosforilasyonu nedeniyle farklı hücresel etkilere yol açar.

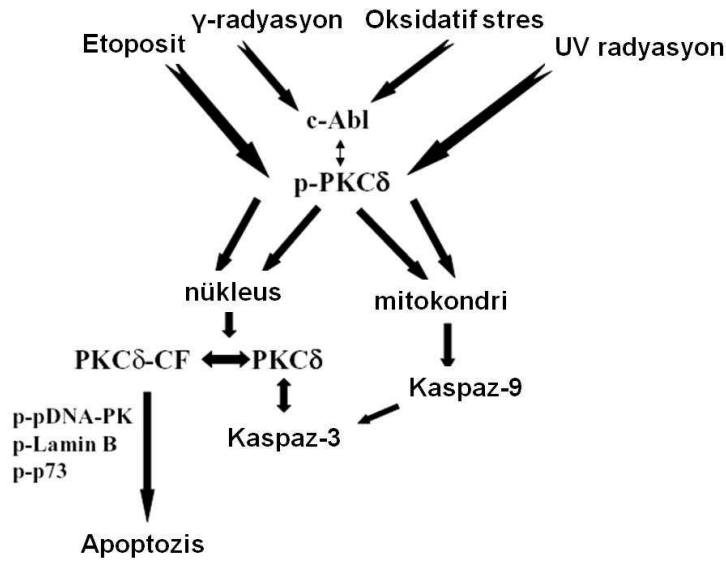
Apoptotik uyarılara cevaben tirozin rezidülerinin fosforillenmesiyle aktive olan PKC δ 'nın pro-apoptotik etkilerinin asıl hedefi, intrinsik apoptotik yolağın ana bileşeni olan mitokondridir. Birçok farklı hücre tipinde PKC δ , hücre içinde oluşan oksidatif strese ve aktivatörü olan PMA'nın uyarımına cevaben mitokondriye transloke olmaktadır. Bu translokasyon sonucunda ise PKC δ , mitokondri membran potansiyelinde azalmaya neden olarak membranın geçirgenlik özelliklerini değiştirir ve bunun sonucunda mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınımını uyarır. Sitokrom c salınımı, daha önce bahsedildiği gibi apoptozisin irreversibl sürece girdiğini gösteren işaretlerden biridir. Bu olay da kaspaz-9'un ve bunu takiben kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olur. Dolayısıyla PKC δ , mitokondriye bağımlı apoptotik yolda apoptozisi anlamlı derecede indüklemektedir. Prostat kanseri hücrelerinde PKC δ , yine mitokondriyal sinyalizasyon üzerinden apoptozisin aktivatörü olan seramid oluşumunu indükler. Sonuçta PKC δ , mitokondri üzerinden kaspaz-9'un aktivasyonuna neden olur [93].

PKC δ , yukarıda bahsedilen apoptotik uyarılara cevaben mitokondriden başka nükleusa da transloke olabilir. Çünkü PKC δ 'nin apoptotik hücrelerdeki substratlarından birçoğu nükleer proteinlerdir. Bunların en başında DNA-bağımlı protein kinazlar (DNA-PK) yer almaktadır. DNA-PK, DNA'nın çift zincir kırıklarının tamirinde kritik role sahip bir proteindir. Aktive olmuş PKC δ , direkt olarak DNA-PK'nin C-terminaline bağlanarak enzimin fosforillenmesini sağlar. Bu da DNA-PK'nin, DNA'dan ayrılmasına ve dolayısıyla DNA tamirinin inhibisyonuna neden olur. Tamir edilemeyen DNA ise, fragmentasyona uğrayarak hücresel apoptozis üzerinden yok edilir [94]. Lamin proteinleri, DNA-PK'den sonra PKC δ 'nin apoptotik etkileriyle ilişkili olan diğer önemli bir nükleer proteindir. Apoptozis sırasında laminin parçalanması, apoptozisin nükleer fazının kilit aşamalarından birisidir. Bu parçalanma ise kaspaz-6 tarafından gerçekleşir. Ancak laminin parçalanmasındaki asıl nokta ise enzimin fosforilasyonu ile ilişkilidir. Son zamanlarda, PKC δ 'nin apoptotik bir lamin kinaz olduğu kanıtlanmıştır. PKC δ , apoptotik bir uyarana cevaben nükleusa transloke olur ve burada direkt olarak lamin B'yi fosforilleyerek enzimin aktivasyonuna yol açar. PKC δ aktivitesi inhibe olursa, hem lamin B'nin fosforilasyonu hem de kaspaz-6 tarafından parçalanması da inhibe olur [95].

PKC δ 'nin apoptozisi indüklediğine dair bir başka mekanizma ise oldukça önemlidir. Bu mekanizma kaspaz-3 ile ilişkilidir. PKC δ , apoptotik uyarılara cevaben kaspaz-3 tarafından parçalanır. Bu parçalanma sonucunda PKC δ 'nin katalitik fraksiyonu (PKC δ -CF) tüm yapıdan ayrılır [96]. PKC δ -CF, PKC δ 'nin apoptotik etkilerinden sorumlu asıl birimdir (Şekil 2.8). Bu altbirim, PKC δ 'dan ayrıldıktan sonra çekirdeğe transloke olarak nükleer fragmentasyonu ve dolayısıyla apoptozisi indükler [97]. PKC δ -CF, bir p53 homologu olan p73 β ve p73 ϵ 'nin, ayrıca tümör supressör geni olarak tanımlanan STAT1 [98] gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu veya inaktivasyonu üzerinden ölüm genlerinin transkripsiyonunu kontrol edebilir. Ren ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, PKC δ -CF'in direkt olarak p73 β ile

etkileşime girerek, proteini fosforillemediği gösterilmiştir [99]. Aktivasyonu sonucunda p73 β , p53 gibi hücre siklusunun aktivatörü olan siklin/siklin bağımlı kinaz (CDK) kompleksini inhibe eden p21'i aktive ederek hücre siklusunu baskılar.

PKC δ üzerindeki kaspaz-3 parçalanma bölgesi, V3 biriminin N-terminali DMQD³³⁰ (Asp-Met-Gln-Asp) dizisindeki aspartik asite komşu olan bölgedir. Bu da katalitik ve regülatör altbirim arasındaki bölgeye tekabül eder. Kaspaz-3'ün PKC δ 'nın parçalanmasındaki rolü, kaspaz-3'e spesifik inhibitörler olan Z-DEVD-fmk ve Z-VAD-fmk'nın kullanılmasıyla kanıtlanmıştır [100]. Tüm bunlara ek olarak ilginç bir nokta göze çarpmaktadır. PKC δ , kaspaz-3 tarafından aktifleşmesinin yanında aynı zamanda kaspaz-3'ün de aktivasyonuna neden olmaktadır. Yani kaspaz-3/PKC δ arasında pozitif bir regülatör loopun mevcut olduğu söylenebilir. PKC δ 'nın ya direkt olarak kaspaz-3'ü etkileyerek onu fosforile ettiği ya da indirekt olarak kaspaz-3'ün upstream regülatörleri olan kaspaz-8 ve kaspaz-9'u fosforilleyerek kaspaz-3'ü aktive ettiği yönünde bulgular mevcuttur [101].



Şekil 2.8. Apoptotik uyarılara cevaben uyarılan PKC δ 'nin hücre içi hedefleri [102].

2.6.2. PKC δ 'nin Hücre Siklusu Üzerindeki Etkileri

PKC δ 'nin apoptozis üzerinde indükleyici etkilere sahip olmasına ilaveten, hücre siklusunun progresyonu üzerinde de negatif düzenleyici olarak fonksiyon görmesi, PKC δ 'nin karsinogenezdeki önemini açıkça ifade etmektedir. Birçok çalışma, PKC δ 'nin hücre siklusunu direkt inhibe ederek proliferasyonu baskıladığını göstermiştir [77], [103]. PKC δ 'nin hücre siklusunu G1/S fazında inhibe ettiği, dolayısıyla hücrelerin DNA replikasyonunun gerçekleştiği S-fazına girişini engellediği akış sitometresi ile yapılan analizlerle insan düz kas ve epitelyal kanser hücrelerinde gösterilmiştir [104]. Bilindiği gibi hücre siklusunun G1/S kontrol noktası çok önemlidir; hücre bu kontrol noktasına

takılmadan geçerse siklus geri dönüşümsüz bir şekilde ilerleyerek hücre hızla proliferer olur. PKC δ bunu iki farklı yolla gerçekleştirir. İlki, G1 fazındaki siklinleri direkt olarak inhibe eder; ikincisi, G1-siklin bağımlı kinazları inhibe eden p21 proteini direkt olarak aktive eder. Dolayısıyla PKC δ , p21'in ekspresyonu için gereklidir. PKC δ 'nın bu etkisi hem rat aort düz kas hücrelerinde [105] hem de meme kanseri hücrelerinde [106] gösterilmiştir. Buna ilaveten hücre siklusununun ikinci kontrol noktası olan G2/M fazında da PKC δ 'nın inhibe edici etkileri insan keratinosit hücrelerinde [107] gösterilmiştir. Böylece hücreler DNA replikasyonundan sonra ikinci önemli aşama olan mitozu giremezler ve siklus durur.

2.7. PKC ϵ

PKC ϵ , PKC δ gibi yeni PKC alt ailesine ait olan ve Ca⁺²'dan bağımsız olarak DAG/forbol ester tarafından aktive edilen bir PKC izozimidir. PKC ϵ , PKC ailesinin onkojenik etkiye sahip olan tek üyesidir. Kanserde aşırı derecede eksprese olan PKC ϵ , birçok hücrel sistemde hem canlılığı hem de apoptozisi kontrol eder. PKC ϵ 'nun kanser ile ilişkili olabileceği bulgusu, ilk defa akciğer kanseri hücrelerinde Baxter ve arkadaşları tarafından ortaya atıldı [108]. Daha sonra ise PKC ϵ 'nun mesane, prostat, meme, böbrek gibi birçok kanserde aşırı derecede eksprese olduğu kanıtlanmıştır. Onkojenik etkinin ortaya çıkması için PKC ϵ 'nun katalitik biriminin gerekli olduğu yönünde bir inanış olmasına rağmen, PKC ϵ 'nun regülör birimi de katalitik aktiviteden bağımsız olarak aynı etkiyi gösterebildiği de belirtilmektedir [109].

2.7.1. PKC ϵ 'nin Apoptozis Üzerindeki Etkileri

PKC ϵ 'nin, apoptozisin iki farklı mekanizması olan hem intrinsik hem de ekstrinsik yolakta fonksiyon gören kilit mediyatörlerle etkileşime girerek apoptozisi inhibe ettiği başta prostat kanseri olmak üzere birçok farklı kanser türünde gösterilmiştir [76]. Bcl-2 ailesinin üyeleri ve kaspazlar, daha önce de bahsedildiği gibi apoptozisin kontrolünde kilit role sahip olan mediyatörlerdir. Mitokondriye bağımlı yolakta etkin olan Bcl-2 ailesinin üyelerinden Bax, Bad, Bak ve Bid pro-apoptotik olmasına karşılık, Bcl-2, Bcl-xL ve Bcl-w anti-apoptotik karakterdedir. PKC ϵ 'nin prostat kanseri hücrelerinde Bax [76] ile, glioma hücrelerinde Bid ve Bad [110] ile direkt olarak etkileşime girerek bunları inaktive ettiği, buna karşılık Bcl-2'yi de akciğer kanseri hücrelerinde aktive ettiği [111] ve bunun sonucunda da apoptozisin geri dönüşümsüz aşaması olan sitokrom c'nin mitokondriden salınımını engellediği gösterilmiştir (Şekil 2.9). Ayrıca kaspaz-9'un da parçalanmasını direkt olarak önleyerek intrinsik yolun downstream mekanizmasını da baskılar [111].

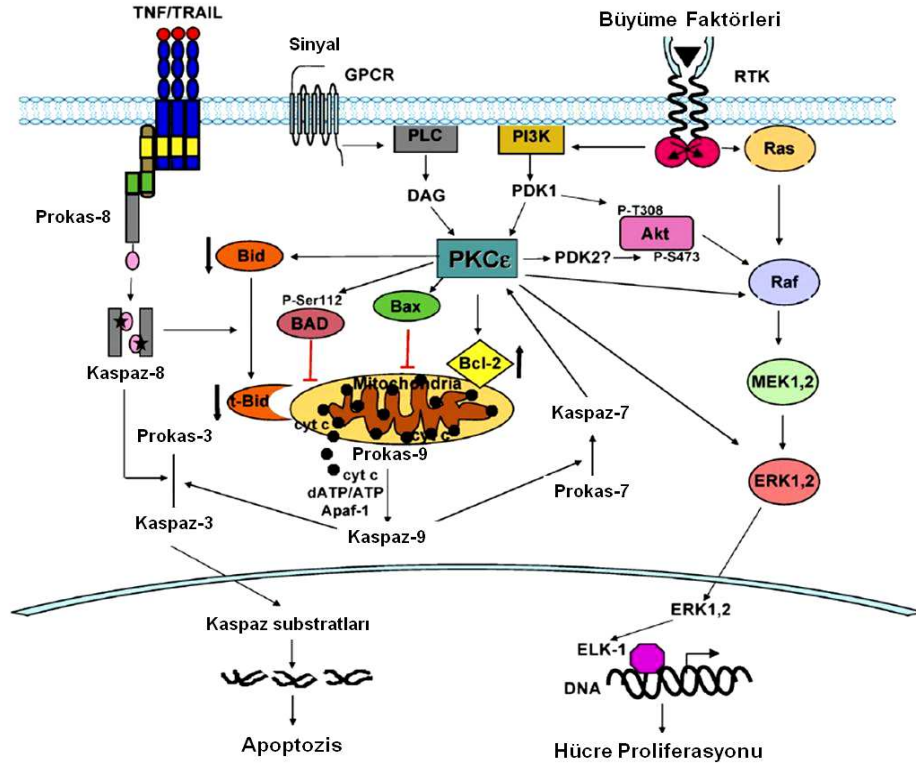
PKC ϵ 'nin intrinsik yolaktaki bu olumsuz etkilerine ek olarak ekstrinsik yolakta da baskılayıcı etkileri mevcuttur. Fas, TNF- α , TNF ilişkili apoptozisi indükleyen ligand (TRAIL) gibi ölüm ligandlarının reseptörleri olan TRAIL reseptörlerine bağlanması sonucunda önce kaspaz-8'in daha sonra kaspaz-10'nun aktivasyonu ile ilişkili olan ekstrinsik yolakta PKC ϵ 'nin, TRAIL aracılı apoptozisi ve kaspaz-8'in parçalanmasını inhibe ettiği glioma hücrelerinde saptanmıştır [112]. Tüm bunlara ek olarak PKC ϵ ,

intrinsik ve ekstrinsik yolağın kesiştiği noktada bulunan kaspaz-3'ün parçalanmasını engelleyerek inaktive eder. Bilindiği gibi kaspaz-3, apoptozis için çok önemli bir proteindir. Çünkü kaspaz-3, direkt olarak nükleustaki hedef proteinlerini parçalayarak onları aktiveleştirir. Bu proteinler arasında DNA fragmantasyonunu sağlayan DFF ve endonükleaz G, ve kromatin kondensasyonunu sağlayan Lamin ve PARP gibi proteinler bulunmaktadır.

PKCε, DNA hasarı indüklü apoptozisi birçok farklı hücrede inhibe eder. PKCε, kemoterapötik ajanlar, açlık ve TNF gibi apoptotik uyarılara cevaben kaspazlar tarafından parçalanır. Yani PKCε, kaspaz-3'ün bir substratıdır. Ancak kaspaz-3 ve kaspaz-7, aynı substrat özgüllüğüne sahip ve her ikisi de DXXD sekansını tanırlar. PKCε, kaspaz-3 ve kaspaz-7 tarafından tanınabilen DDVD↓C bölgesine sahiptir. Bu nedenle PKCε, kaspaz-3 gibi kaspaz-7 tarafından da parçalanabilir. Hatta kaspaz-7'nin PKCε'nun parçalanmasındaki asıl kaspaz olduğu belirtilmektedir [113].

2.7.2. PKCε'nun Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkileri

PKCε, aşırı ekspresyonu nedeniyle hem transformasyonu hem de proliferasyonu indüklediği gösterilen yegane PKC üyesidir. Onkojenik PKCε'nun, başta prostat kanseri olmak üzere birçok kanserin progresyonu ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır [76]. Hücre canlılığını, büyüme ve farklılaşmayı kontrol eden birçok farklı serin/treonin protein kinazlar ile yapısal olarak ilişkili olan MAPK'lar, daha önce de bahsedildiği gibi karsinogeneziste çok önemli roller oynarlar. PKCε, MAPK ailesinin üyeleri olan p38, c-Jun N-terminal kinaz (JNK)-1, JNK2, MEK1, ERK1, ERK2, Ras, Raf ile direkt olarak etkileşime girerek mitojenik aktiviteyi artırır [114]. Bunun dışında PKCε'nun, diğer bir proliferatif yolak olan PKB/Akt'yi de direkt olarak aktive ettiği meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir (Şekil 2.9). PKCε, Akt üzerinde bu yöndeki etkisini çift zincirli DNA hasarlarının tamirinden sorumlu kilit bir enzim olan DNA-PK aracılığıyla yapar [115]. Akt'nin aktive olması sonucunda ise, hücre apoptoza dirençli kılınır ve canlılık devam eder.

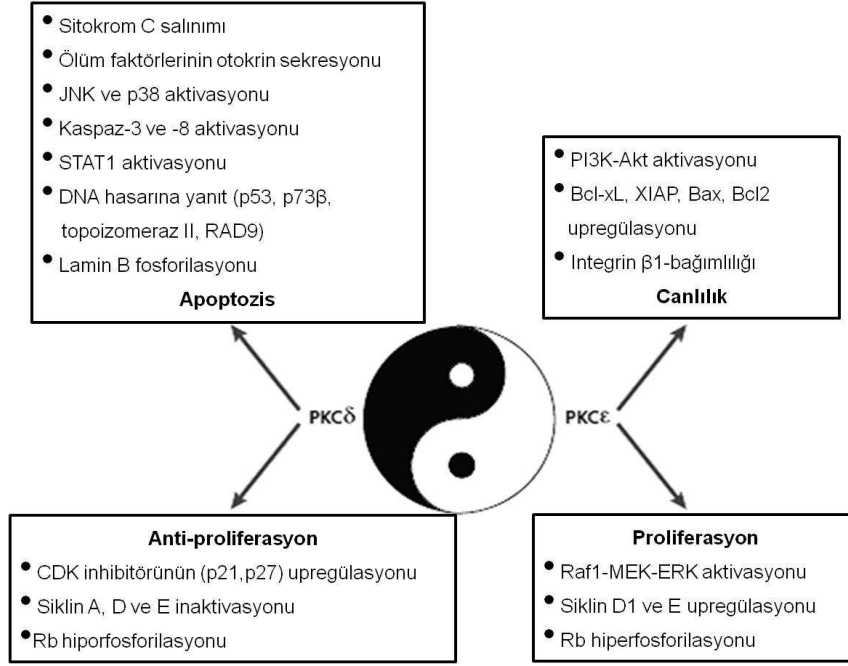


Şekil 2.9. Hücre proliferasyonunun ve hücre ölümünün PKCε tarafından kontrolü [116].

PKCε, direkt olarak hücre siklusunu mediyatörleri ile etkileşime girerek siklusu uyarır ve büyüme/ bölünmeyi artırır. Bunu temel olarak üç mekanizma ile yapar. İlki, siklusun G1/S kontrol noktasında inhibitör yönde kilit fonksiyonu olan tümör baskılayıcı gen retinoblastomayı inhibe eder; ikincisi, yine siklusun G1 fazındaki aktivatörler olan siklinlerin ekspresyonunu indükler [117]; üçüncüsü ise genom bekçisi olarak tanımlanan p53 proteini baskılar [118].

PKCε, anjiyogenez, invazyon ve metastaz ile de yakından ilişkilidir. Kanser hücrelerindeki büyüme çoğalmanın çok hızlı olması hücreyi, anaerobik solunum yapmaya iter. Oksijen yokluğu ise hipoksi uyarıcı faktör-1α (HIF-1α)'yı aktive eder ve sonuçta hücrelerin daha fazla oksijen alabilmesini sağlamak amacıyla, çok önemli anjiyogenik faktörler olan VEGF ve COX-2 ile ekstraselüler matrisi yıkan MMP'ler aktive olur. PKCε, direkt olarak HIF-1α ve COX-2 ile etkileşime girerek tümör hücrelerinin büyümesi için gerekli olan damarlanmayı uyarır. Ayrıca PKCε, Src proto-onkogeni ile de direkt olarak etkileşime girerek Src aktivasyonunu artırır. Src, hücre-hücre etkileşimini düzenleyen reseptörler olan integrinlerin alt birimi olan fokal adezyon kinazı (FAK) fosforilleyerek integrini aktive eder ve sonuçta adezyon moleküllerinin formasyonunu gerçekleştirir. Karsinogenezdeki tüm bu olumsuz etkilerine ilaveten PKCε, çoklu ilaç direncinin gelişmesinde kilit bir protein olan P-glikoproteinini indüksiyonuna da yol açarak kanser tedavisi üzerinde de olumsuz etkilere sahiptir [119].

PKC δ ve PKC ϵ 'nin hücre proliferasyonu ve apoptozis dolayısıyla karsinogenezis üzerindeki baskın ve birbirine zıt etkilerinin mekanizması Şekil 2.10.'da toplu olarak şematize edilmiştir.



Şekil 2.10. PKC δ ve PKC ϵ 'nin hücre proliferasyonu ve apoptozisi üzerindeki zıt etkileri [6]

2.8. PKC δ ve PKC ϵ 'nin S-tiyolasyonu

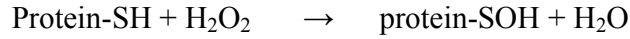
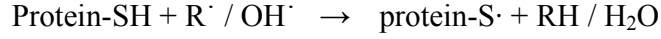
Hücre içinde bulunan birçok protein ve enzimler, yan zincirlerinde sülfidril grubu bulunan sistein rezidüleri ve çeşitli sayıda biyokimyasal etkileşimler için molekülü hareketli kılan çinko, demir gibi metaller içerirler. Sisteindeki sülfidril grupları, yapıdaki metal iyonları ile koordinasyon bağı kurarak metalin molekül içerisinde tutunması ve bunun yanında oksidasyon/redüksiyon değişikliklerine karşı proteinin yapısının korunmasında oldukça önemli bir rol oynamaktadır.

Hemostazisin sağlanabilmesi için hücrel redoks potansiyeli kilit bir öneme sahiptir. Redükleme kuvveti yüksek olan bir çevre, enerji üretimini ve tiyolleri redükte durumda kalmasını sağlayan oksidasyon reaksiyonlarının ara ürünleri olan reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) üretimini engeller. Hücreler, ROS üretimine karşı tiyol/disülfid redoks çiftleri ile korunurlar. Bu çiftlerden de en çok bilineni redükte glutatyon/okside glutatyon (2GSH/GSSG) çiftidir.

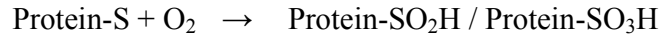
Yüksek derecede reaktif olan tiyol grupları (-SH), oksijenlenmiş sistemlerde S-S formuna hızlı bir biçimde okside olurlar. Oksidasyon hızı ise, tiyollerin yapısına, pH'a, tamponun bileşenlerine ve reaksiyonda kullanılan katalizörün tipine bağlıdır. Disülfid

grupları (S-S), SH gruplarına göre daha az reaktiftir. Tiyoller ile disülfidler arasında gerçekleşen değişim reaksiyonu, disülfidler ile ilişkili olan önemli biyolojik reaksiyondur.

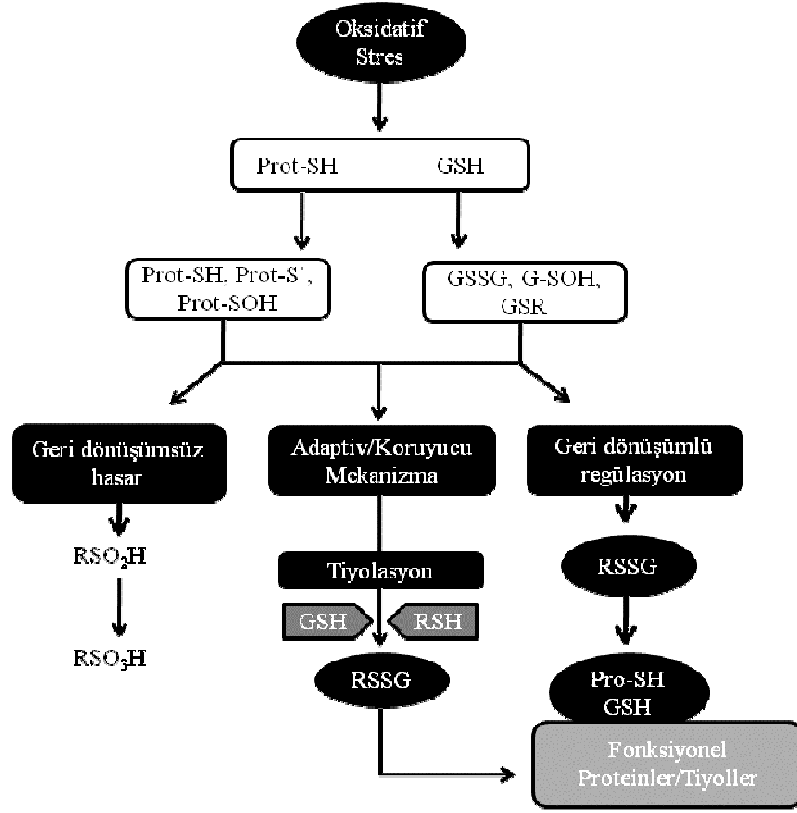
Yapısında tiyol içeren birçok redoks-sensitif protein bulunmaktadır. Tiyoredoksin (Trx), sitokrom C, p53 ve PKC δ pro-apoptotik gruba ait olanlara, PKC ϵ ise onkojenik anti-apoptotik gruba ait olan başlıca proteinlerdir. PKC δ ve PKC ϵ 'nin aktivasyonu için gerekli olan DAG, enzimin regülatör kısmına bağlanmalıdır. Enzimin regülasyonunda kritik role sahip bu bölge, hem PKC δ 'da hem de PKC ϵ 'da her bir yapıda 6 sistein olacak şekilde iki Zn²⁺ parmak yapısını içermektedir. Buna ilaveten katalitik kısım da 5-8 sistein birimi içermektedir. Sisteince zengin olan PKC δ ve PKC ϵ 'nin yapısında toplam 16-28 sistein birimi bulunmaktadır. Ancak, pro-oksidan şartlardan veya oksidatif stresten dolayı sistein birimlerinde değişiklik meydana gelir. Bu olay ise S-tiyolasyon olarak adlandırılır [7], [120]. S-tiyolasyon, oksidatif patlamadan sonra sadece dakikalar içinde gerçekleşir ve temel olarak iki mekanizma aracılığıyla olduğuna inanılmaktadır. Bunlardan ilki, protein disülfite bağlı olarak değişen GSSG konsantrasyonunun, oksidasyon için baskın mekanizma olmasıdır. Ancak, hücreler normal şartlarda gerekli GSSG düzeylerine ulaşamadıklarından dolayı bu mekanizma pek mümkün gibi görünmemektedir. İkinci görüş olan GSH-bağımlı tuzak mekanizma ise, protein-SH'nin tiyil radikaline mi (protein-S \cdot) yoksa sülfenik asite mi (protein-SOH) okside olduğu tartışmasına rağmen, S-tiyolasyon için primer mekanizma olduğu düşünülmektedir.



Bu aktive olmuş protein ara formları daha sonra hücresel GSH ile bağlanmış disülfid eklentilerini oluşturabilir. Bu nedenle böyle bir mekanizmada, tiyil radikali veya sülfenik asit formundaki okside olmuş protein sisteinlerinin efektif olarak nötralize edilebilmesi GSH miktarına bağlıdır. Bu geri dönüşümlü bir mekanizmadır. Ancak bunun zıttı olarak ortamda yeterli glutatyon olmazsa okside protein sisteinleri, oksijen veya diğer oksidanlar ile reaksiyona girerek geri dönüşümsüz olarak okside sülfenik (RSO₂H) ve sülfonik (RSO₃H) asit ürünleri oluşturabilir (Şekil 2.11) [120].



GSH havuzunda anlamlı derecede bir kayıp meydana gelirse yukarıda mekanizma kaçınılmaz olur. Bu nedenle yüksek GSH konsantrasyonu, oksidatif protein hasarına karşı koyulmasında hücrenin evrimsel bir silahıdır.



Şekil 2.11. Protein S-tiyolasyon mekanizması [120].

S-tiyolasyon reaksiyonları genellikle geri dönüşümlüdür ve belki de bunlar hücrenin bir koruma/adaptasyon mekanizmasının bir parçasıdır. Oksidatif modifikasyon sırasında, redoks değişikliklerinin tüm protein molekülüne sıçramasını önlemek amacıyla, önce proteinin yüzeyindeki sistein birimleri strese maruz kalırlar. Yüzeydeki sistein rezidüleri, hücrenin redoks sensörü olarak işlev gördüğü için normalde redükte formda tutulurlar. Bu rezidüler, proteinin katalizi, regülasyonu, elektron transferi ve yapı/fonksiyon gibi fonksiyonları ile ilişkilidir. Ancak S-tiyolasyon, oksidasyonun derecesine ve protein yapısı içerisindeki hangi sistein rezidüsünün okside olduğuna bağlı olarak her zaman bir koruma mekanizması sağlamaz. Tam tersine S-tiyolasyon aracılı oksidatif modifikasyon, proteinin fonksiyonunu olumsuz yönde değiştirerek birçok hücrenel olayların önemli ölçüde farklılaşmasına neden olur.

Her iki izoenzimin regülatör bölgelerindeki sistein birimlerinin S-tiyolasyonu, enzimlerin aktivitelerinde değişikliğe neden olur. Ancak bu değişikliğin yönü, PKC'nin izoenzimine göre değişmektedir. S-tiyolasyon sonucunda PKC δ 'nin aktivitesinin azaldığı, buna karşılık PKC ϵ 'ninkinin ise arttığı belirtilmiştir [8]. Enzimlerde gözlenen bu fonksiyon bozukluklarının geri kazanılabilmesi için farklı ajanlar denenmiştir. Bunların başında redükte tiyol bileşikleri bulunmaktadır. Ancak redükte tiyol bileşiklerin aksine sistin, GSSG, diamid gibi oksidatif bileşiklerin S-tiyolasyona bağlı

olarak bozulan enzim aktivasyonunu, S-sisteinilasyon (PKC-S-S-Cys) aracılığıyla düzelttiği transforne olmuş maymun böbrek hücrelerinde gösterilmiştir [121]. Çünkü tiyol antioksidanların disülfid formları, PKC ϵ ve PKC δ 'a bağlanabilmek için tümörjenik olan forbol esterleri ile yarışmaya girerek bunların enzime bağlanmasını engeller. Belirtilen bu oksidatif maddelerle kıyaslandığında, sistinin metabolik bir öncüsü olan CDME'nin, hücre içerisinde esterazlar tarafından sistine dönüştürülmesi ve bu esterifikasyonun membranın geçirgenlik özelliklerini güçlendirmesi nedeniyle enzimler üzerinde daha etkili olduğu belirtilmiştir [122].

MATERYAL VE METOD

3.1. Hücre Kültürü

Hücre Dizileri: Deneyler 3 farklı prostat hücresinde gerçekleştirildi. Bunlar; kontrol amacıyla kullanılan nontümörjenik prostat epitelyum hücresi RWPE-1 ve iki farklı tipte prostat kanseri hücresi olan prostat karsinoma-3 (PC-3) ile LNCaP'dir. PC-3, androjen-bağımsız agresif tipte ve kemik metastazına sahipken, LNCaP androjen-bağımlı ve lenf nodu metastazına sahiptir. Tüm hücreler, ATCC (Manassas, VA, USA)'den temin edildi.

Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar:

- Medyumlar: Roswell Park Memorial Institute (RPMI), F12K ve Keratinosit, kullanıma hazır sıvı halde steril şişe içerisinde Invitrogen'den (Carlsbad, CA, USA) temin edildi ve kullanım süresince +4 °C'de saklandı.
- Serum ve büyüme faktörleri: Fetal Sığır Serumu (FBS), 5 ng/ml insan rekombinant EGF ve 0.05 mg/ml sığır hipofiz ekstraktı, kullanıma hazır sıvı halde steril şişe içerisinde Invitrogen'den (Carlsbad, CA, USA) temin edildi ve kullanım süresince -20 °C'de saklandı.
- Diğer solüsyonlar: Tripsin-EDTA (%0.25), 1x fosfat tamponlu tuz (PBS) ve penisilin/streptomisin antibiyotik solüsyonları, kullanıma hazır sıvı halde steril şişe içerisinde Invitrogen'den (Carlsbad, CA, USA); dimetil sülfoksit (DMSO) ve tripan mavi (%0.4) ise Sigma'dan (St.Louis, MO, USA) temin edildi.

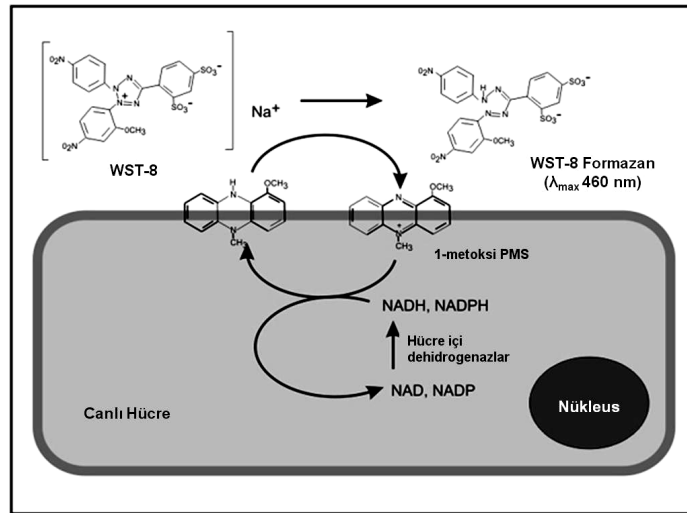
Hücrelerin Kültüre Edilmesi: Belirtilen 3 farklı tipteki prostat hücrelerinin kültüre edilmesi için her bir hücreye özgü besi ortamları kullanıldı. Buna göre RWPE-1 hücreleri, 5 ng/ml insan rekombinant EGF ve 0.05 mg/ml sığır hipofiz ekstraktı içeren Keratinosit medyumunda; LNCaP hücreleri, 10% oranında FBS ve 2 mM L-glutamin içeren RPMI medyumunda; PC-3 hücreleri ise, 5% oranında FBS ve 2 mM L-glutamin içeren F12K medyumunda kültüre edildi. Ayrıca bakteri kontaminasyonunun önlenmesi amacıyla, 100 ünite/ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisinden oluşan antibiyotik solüsyonundan %1 oranında kültür medyumlarına eklendi. Tüm hücre dizileri, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren inkübatörde 37 °C'de bekletilerek canlılıklarının devamı sağlandı. Steril 75 cm²'lik kültür flasklarında üretilen hücreler yaklaşık %80 yoğunluğa ulaşana kadar beslendi, ancak bu yoğunluktan sonra Tripsin-Etilen diamin tetraasetik asit (Tripsin-EDTA) yardımıyla yapıştıkları flaskın yüzeyinden kaldırıldı ve yine kendi medyumunu içerisinde steril yeni bir flaska aktarıldı. Böylece hücrelerin

çoğalması sağlandı. Kültürleme işlemi sırasında hücreler, 1x PBS ile yıkandı. Hücre sayımı ise tripan mavi solüsyonu ile toma lamında gerçekleştirildi.

Hücrelerin dondurulması: Hücreler, dondurma medyumunu içerisinde kademeli olarak dondurulduktan sonra kullanıma kadar sıvı nitrojende saklandı. Bu amaçla, Tripsin-EDTA ile flaskın yüzeyinden ayrılmasıyla elde edilen hücre süspansiyonu 600 x g'de 8 dakika santrifüj edildi. İşlem sonunda elde edilen hücre peleti, dondurma medyumunu ile resüspanse edilerek 2ml'lik steril dondurma tüplerine aktarıldı. Dondurma medyumunu, %20 FBS içeren hücre medyumununun 0.45 µm'lik şırınga filtrelerinden geçirilmesiyle ve takibinde bu karışıma koruyucu amaçla %10 DMSO eklenmesiyle taze olarak hazırlandı.

3.2. WST-8 Deneyi

Prensip: Hücrelerin, CDME ile muamelesinin takibinde gelişen sitotoksik cevabın saptanması amacıyla yapıldı. Deneyin prensibi, WST-8'in [2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-monosodyum tuzu], bir elektron taşıyıcısı olan 1-metoksi fenazin metosülfat (1-metoksi PMS) varlığında mavi renkli formazana indirgenmesi esasına dayanır [123]. Elektron taşıyıcılığı görevini ise, canlı hücrelerdeki dehidrogenazlar gerçekleştirir (Şekil 3.1). Dolayısıyla formazan oluşumu, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Oluşan mavi rengin yoğunluğu 460 nm'de spektrofotometrede ölçülür. Nonradyoaktif olan WST-8 deneyi, hücre proliferasyonu ve sitotoksitesi deneylerinde canlı hücrelerin sayısının tayin edilmesine izin veren hassas kolorimetrik bir ölçüm yöntemidir. WST-8'in hücre sitotoksitesi ölçümündeki hassasiyeti, diğer tetrazolyum tuzları olan MTT, XTT, MTS veya WST-1'den çok daha yüksektir.



Şekil 3.1. WST-8'in formazana indirgenmesi [123].

Kullanılan kit:

- Dojindo Laboratories (Gaithersburg, MD, USA) firmasından temin edilen Cell Counting Kit-8 adlı ürün kullanıldı.

CDME'nin hazırlanması: Sigma'dan (St.Louis, MO, USA) temin edilen CDME (MW: 341.28), hassas terazide 0.3412 g tartıldı ve üzerine 1 ml steril kültür medyumunu laminar flow kabin içerisinde eklendi. Hazırlanan 1M'lık bu ana stok solüsyondan 0.1 mM, 1 mM, 10 mM, 100 mM ve 400 mM olmak üzere 5 farklı ara stok solüsyonlar hazırlandı. Ana ve ara stok solüsyonlar, her bir deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı.

Hücrelerin hazırlanması ve deney prosedürü: RWPE-1, PC-3 ve LNCaP hücreleri, tripsin-EDTA yardımıyla buldukları flaskın yüzeyinden kaldırıldı ve oluşan hücre süspansiyonu 1000 x g'de 6 dakika santrifüj edilerek hücre peleti elde edildi. Spesifik medyumları ile resüspanse edilen hücreler, her bir kuyucukta 2000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu steril hücre kaplarına bölüştürüldü. Yüzeye yapışmaları için gece boyunca inkübatörde bekletilen hücreler, ertesi sabah farklı dozlardaki CDME ile muamele edildi. Bunun için 0.005 mM, 0.05 mM, 0.5 mM, 5 mM ve 20 mM olmak üzere 5 farklı doz seçildi. 95 µl spesifik kültür medyumunu bulunan her bir kuyucuğa, yukarıda belirtilen 0.1 mM, 1 mM, 10 mM, 100 mM ve 400 mM'lık ara stok solüsyonlardan ilgili kuyucuğa 5 µl eklendi. Böylece CDME'nin kuyucuklardaki final konsantrasyonu sırasıyla, 0.005 mM, 0.05 mM, 0.5 mM, 5 mM ve 20 mM sağlanmış oldu. WST-8 deneyi için RWPE-1, PC-3 ve LNCaP hücreleri, 96 kuyucuklu steril hücre kaplarına Şekil 3.2'de belirtildiği gibi bölündü.

	RWPE-1				PC-3				LNCaP			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CDME yok	CDME yok	CDME yok		CDME yok	CDME yok	CDME yok		CDME yok	CDME yok	CDME yok	
B	0.005 mM CDME	0.005 mM CDME	0.005 mM CDME		0.005 mM CDME	0.005 mM CDME	0.005 mM CDME		0.005 mM CDME	0.005 mM CDME	0.005 mM CDME	
C	0.05mM CDME	0.05mM CDME	0.05mM CDME		0.05mM CDME	0.05mM CDME	0.05mM CDME		0.05mM CDME	0.05mM CDME	0.05mM CDME	
D	0.5mM CDME	0.5mM CDME	0.5mM CDME		0.5mM CDME	0.5mM CDME	0.5mM CDME		0.5mM CDME	0.5mM CDME	0.5mM CDME	
E	5mM CDME	5mM CDME	5mM CDME		5mM CDME	5mM CDME	5mM CDME		5mM CDME	5mM CDME	5mM CDME	
F	20mM CDME	20mM CDME	20mM CDME		20mM CDME	20mM CDME	20mM CDME		20mM CDME	20mM CDME	20mM CDME	
G	Yalnız RWPE-1 medyum	Yalnız RWPE-1 medyum	Yalnız RWPE-1 medyum		Yalnız PC-3 medyum	Yalnız PC-3 medyum	Yalnız PC-3 medyum		Yalnız LNCaP medyum	Yalnız LNCaP medyum	Yalnız LNCaP medyum	

Şekil 3.2. Hücrelerin, sitotoksosite deneyi için 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki dağılımı

CDME ile muamele edilen hücreler 48 saat boyunca %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren inkübatörde 37 °C'de bekletildi. Süre sonunda WST-8 solüsyonundan 10 µl, her bir kuyucuğa eklendi ve hücreler tekrar 4 saat boyunca inkübe edildi. Canlı hücrelerde oluşan mavi renkli formazanın absorbans değerleri, mikropate okuyuculu spektrofotometrede 450 nm'de köre karşı elde edildi. Hücrelerin spesifik medyumları, kör olarak kullanıldı. Ayrıca hücre sitotoksitesinin ölçümü, her bir deneyde üçlü olmak üzere birbirinden bağımsız deneylerle üç farklı zamanda tekrarlandı.

3.3. CBP Ölçümü

Prensip: CBP ölçümü, hücrelerin CDME muamelesini takiben hücre içi sistin düzeylerindeki artışın saptanması amacıyla yapıldı. Deney, radyoaktif işaretli CBP'nin hücre içindeki sistini bağlaması sonucunda serbest kalan radyoaktif CBP'nin ölçülmesi prensibine dayanır [124].

Kullanılan Solüsyonlar:

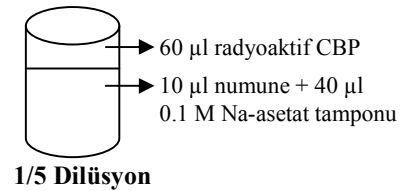
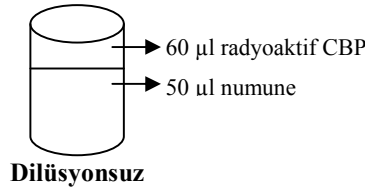
- 0.01 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.2); Ayrı ayrı 1L distile su içerisinde 1.38 g NaH₂PO₄ ve 1.42 g Na₂HPO₄ çözünmesiyle oluşan iki ayrı solüsyon, pH 7.2 olacak şekilde karıştırıldı ve tampon solüsyonu +4 °C'de saklandı.
- 5 mM N-etilmaleimid solüsyonu; 0.006 g N-etilmaleimid, 10 ml hacmindeki 10 mM sodyum fosfat tamponunun içinde çözündü ve +4 °C'de saklandı.
- %12 Sülfosalisilik asid (SSA) solüsyonu; 12 gr SSA tartılıp 100 ml distile su içerisinde çözündü ve +4 °C'de saklandı.
- 3M Ditiyotritol (DTT) solüsyonu; 0.4627 g DTT tartılıp 1 ml distile su içerisinde çözündü ve -20 °C'de saklandı.
- 0.1 M Sodyum asetat tamponu (pH 5); 1M asetik asitten 28.82 ml ve 0.3M sodyum asetat 273.3 ml, final hacim 1L olacak şekilde distile su içerisinde karıştırıldı ve +4 °C'de saklandı.
- 0.01 M Sodyum asetat tamponu (pH 5); 0.1 M sodyum asetat tamponu distile su ile 10 kat dilüe edildi.

Solüsyonların hazırlanmasında kullanılan tüm maddeler Sigma'dan (St.Louis, MO) temin edildi.

CDME'nin hazırlanması: 0.03412 g tartılan maddeye, 100 µl steril kültür medyumunu laminer flow kabin içerisinde eklendi ve böylece 1 M'luk ana stok solüsyon hazırlandı. Yine steril kültür medyumunu ile ana stok solüsyondan, 0.05 M ve 0.5 M'luk ara stok solüsyonlar hazırlandı. Ana ve ara stok solüsyonlar, her bir deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı.

Hücrelerin hazırlanması ve deney prosedürü:

- RWPE-1, PC-3 ve LNCaP hücreleri, tripsin-EDTA yardımıyla buldukları flasksın yüzeyinden kaldırıldı ve oluşan hücre süspansiyonu 1000 x g'de 6 dakika santrifüj edilerek hücre peleti elde edildi. Spesifik medyumları ile resüspanse edilen hücreler, her bir kuyucukta 400.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu steril hücre kaplarına bölüştürüldü. Yüze yapışmaları için gece boyunca inkübatörde bekletilen hücreler, ertesi sabah 0.5 mM ve 5 mM CDME ile muamele edildi. Bu amaçla, 6 kuyucuklu hücre kabının her bir kuyucuğunda bulunan 1980 µl medyuma, 0.05 M ve 0.5 M'lık ara stok solüsyonlardan 20 µl eklenerek CDME'nin final konsantrasyonunun sırasıyla 0.5 mM ve 5 mM olması sağlanmış oldu. Hücreler CDME ile 1.5 saat boyunca 37 °C'lik inkübatörde bekletildi.
- CDME muamelesinin sonlandırılması amacıyla eski medyumları aspire edilen hücreler, 1x PBS ile iki defa yıkandı ve her bir kuyucuğa 300 µl N-etilmaleimid solüsyonundan eklenerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Hücre toplayıcı yardımıyla hücre kaplarından ependorf tüplere aktarılan hücreler, 10 saniye süresince sonike edildi. Ortamdaki proteinleri çöktürmek amacıyla hücre süspansiyonuna %12 SSA solüsyonundan 100 µl eklendi ve hücreler 10 saniye buzda inkübe edildi. 22000 x g'de 10 dakikalık santrifüjün ardından elde edilen süpernatant yeni bir ependorf tüpüne aktarılır ve 150 µl 10 mM Na₂HPO₄ eklenerek pH 5'e ayarlandı. Her bir ependorf tüpündeki hacmin eşitlenmesi amacıyla, bidistile su ile final hacimler 1 ml'e tamamlandı. Böylece numuneler CBP ölçümü için hazır duruma getirildi. Ayrıca, CDME tarafından indüklenen hücresel yanıtların tersinir olarak gösterilmesi amacıyla ilgili numuneler, 30 mM DTT ile 30 °C'de 15 dakika süresince inkübe edildi.
- CBP ölçümü için kör olarak 0.1 M Na-asetat tamponu, standart olarak ise 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1 nmol olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda sistin kullanıldı. Numuneler de aşağıda belirtildiği gibi dilüsyonsuz ve 1/5 oranında 0.1 M Na-asetat tamponu ile dilüe edilerek ölçüldü. 50 µl kör, 50 µl standart ve 50 µl numunenin üzerine 60 µl radyoaktif CBP eklendi.

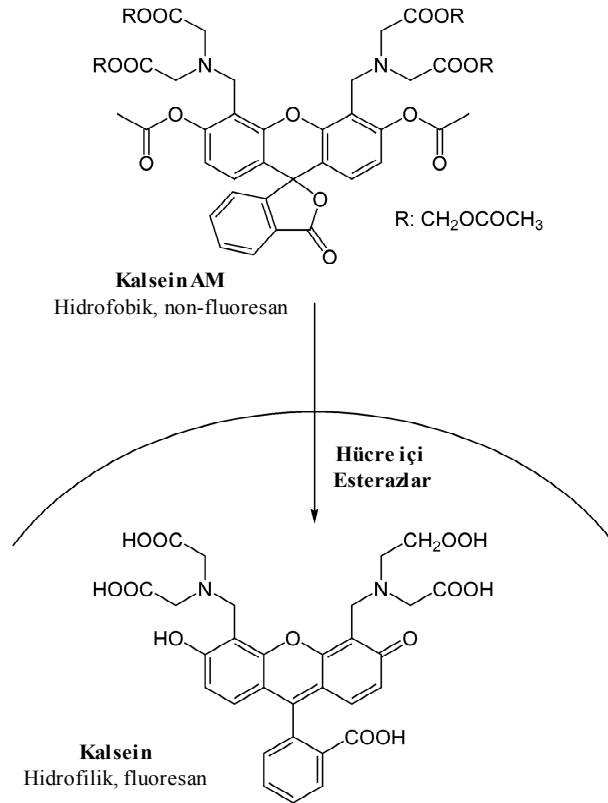


- Hazırlanan tüm standart ve numuneler, nitroselüloz bir membrandan filtre edildi. Bunun için bidistile su içerisinde bekletilen membranlar, filtrasyon işleminin öncesinde ve sonrasında 600 µl 0.01 M Na-asetat tamponu ile yıkandı. Bunu takiben önce 100 µl kör, daha sonra 100 µl standartlar ve son olarak da aynı hacimdeki numuneler filtre edildi. Filtrasyon işlemi tamamlandıktan sonra tüm

nitroselüloz membranlar, aliminyum folyo üzerinde kurumaya bırakıldı. Kuruyan membranlar, üzerlerindeki örneklerin çözünbilmesi amacıyla 3 ml sintilasyon sıvısına kırılmadan aktarılarak Beckman marka sıvı sintilasyon sayacında numunelerdeki sistin miktarları tayin edildi. Hücre içi sistin miktarının saptanması amacıyla yapılan CBP ölçümü, her bir deneyde üçlü olmak üzere birbirinden bağımsız deneylerle üç farklı zamanda tekrarlandı.

3.4. Kalsein AM Deneyi

Prensip: Kalsein AM deneyi, hücre apoptozisinin gösterilmesi amacıyla yapıldı [125]. Non-fluoresan ve hidrofobik bir madde olan kalsein AM'nin, kolayca canlı hücrelerin membranlarından içeri girerek hücre içi esterazlar tarafından, hidrofilik ve kuvvetli yeşil bir fluoresan madde olan kalseine hidrolize olması prensibine dayanır (Şekil 3.3). Sadece membran bütünlüğünü kaybetmemiş canlı hücreler aktif esteraz aktivitesine sahip olduğundan, kalseinin fluoremetrik metodlarla belirlenmesi canlı hücrelerin varlığı için iyi bir göstergedir.



Şekil 3.3. Kalsein AM'nin, hücre içi esterazlar tarafından kalseine hidrolizi

Kullanılan Kit: Molecular Probes (Eugene, OR, USA) firmasına ait Vybrand Cell Adhesion Assay Kit adlı ürün kullanılmıştır.

CDME'nin hazırlanması: CBP deneyinde olduğu gibi CDME, 1 M'lük ana stok solüsyonu ve 0.05 M ile 0.5 M'lük ara stok solüsyonları olmak üzere taze olarak hazırlandı.

Hücrelerin hazırlanması ve deney prosedürü:

- RWPE-1, PC-3 ve LNCaP hücreleri tripsin-EDTA yardımıyla buldukları flaskın yüzeyinden kaldırıldı ve oluşan hücre süspansiyonu 1000 x g'de 6 dakika santrifüj edilerek hücre peleti elde edildi. Spesifik medyumları ile resüspanse edilen hücreler, her bir kuyucukta 300.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu siyah steril kültür kaplarına bölüştürüldü. Herhangi bir muameleye uğramamış ve 0.5 mM CDME / 5 mM CDME ile muamele edilmiş hücrelere ait numuneler, üçlü olarak çalışıldı. Yüzeye yapışmaları için gece boyunca inkübatörde bekletilen hücreler, ertesi sabah 0.5 mM ve 5 mM CDME ile muamele edildi. Bu amaçla, 6 kuyucuklu kültür kaplarının ilgili kuyucuklarına 0.05 M ve 0.5 M'lük ara stok solüsyonlardan 20 µl eklenerek 2 ml'lik total hacimde CDME'nin final konsantrasyonunun sırasıyla 0.5 mM ve 5 mM olması sağlanmış oldu. Hücreler CDME ile 1.5 saat boyunca 37 °C'lik inkübatörde bekletildi.
- Hücreler CDME'den sonra ise apoptozisin indüklenmesi amacıyla TNF-α ile inkübe edildi. Bu amaçla hücreler, 50 ng/ml TNF-α ile 18 saat boyunca inkübatörde bekletildi [126]. Süre sonunda hücreler, serumsuz medyum içerisinde toplayıcı yardımıyla kültür kaplarından ependorflara aktarıldı. 1000 x g'de 6 dakika santrifüj sonucu elde edilen hücre peleti, 500 µl serumsuz medyum içerisinde resüspanse edildi ve final konsantrasyonu 5 µM olacak şekilde kalsein AM ile 30 dakika boyunca inkübatörde inkübe edildi. Sonuç olarak hücre içinde oluşan kalseinin verdiği floresan miktarı, 490 nm eksitasyon ve 520 nm emisyon filtresine sahip mikropate okuyuculu spektrofotometrede kaydedildi.

3.5. DNA Fragmantasyonu

Prensip: Nükleer DNA'nın endonükleaz aracılı parçalanması, apoptozisin karakteristik en büyük kanıtlarından biridir. DNA fragmantasyon deneyi ile hem intakt hem de fragmente olmuş DNA'lar izole edilir ve agaroz jel üzerinde gösterilir. Ayrıca ortamdaki RNA'ların ve proteinlerin elimine edilmesi amacıyla RNaz ve proteinaz-K kullanılması daha saf bir DNA numunesi elde edilmesini sağlar.

Kullanılan Solüsyonlar:

- Lizis tamponu: 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA ve % 0.5 Sodyum dodesil sülfat (SDS) ile hazırlandı. Ayrıca RNA kontaminasyonunun önlenmesi amacıyla bu karışıma final konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde RNaz-A eklendi.
- Proteinaz-K solüsyonu: 200 mg/ml konsantrasyona sahip olan solüsyon hazır olarak temin edildi.
- 1 M NaCl solüsyonu: 5.845 g NaCl tartılıp 100 ml distile suda çözüldü ve +4 °C'de saklandı.
- 50 mM Na-asetat solüsyonu: 0.6804 g Na-asetat tartılıp 100 ml distile suda çözüldü ve +4 °C'de saklandı.
- 1X Tris-EDTA tamponu: 10mM Tris-HCl (pH 8.0) ve 1mM EDTA ile hazırlandı.
- RNaz-A ve Proteinaz-K Invitrogen'den (Carlsbad, CA, USA), diğer maddeler ise Sigma'dan (St.Louis, MO, USA) temin edildi.

CDME'nin hazırlanması: Önceki deneylerde belirtildiği gibi CDME, 1 M'lık ana stok solüsyonu ve 0.05 M ile 0.5 M'lık ara stok solüsyonları olmak üzere hazırlandı. Ana ve ara stok solüsyonlar, her bir deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı.

Hücrelerin hazırlanması ve deney prosedürü:

1.gün: RWPE-1, PC-3 ve LNCaP hücreleri, tripsin-EDTA yardımıyla buldukları flaskın yüzeyinden kaldırıldı ve oluşan hücre süspansiyonu 1000 x g'de 6 dakika santrifüj edilerek hücre peleti elde edildi. Spesifik medyumları ile resüspanse edilen hücreler, her bir kuyucukta 600.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu steril kültür kaplarına bölüştürüldü. Herhangi bir muameleye uğramamış ve 0.5 mM CDME ile 5 mM CDME ile muamele edilmiş hücrelere ait numuneler olmak üzere 3 grup çalışıldı. Hücreler, yüzeye yapışmaları için gece boyunca inkübatörde inkübasyona bırakıldılar.

2.gün: Hücreler ertesi sabah CDME ile muamele edildi. Bu amaçla 6 kuyucuklu kültür kabının ilgili kuyucuklarına 0.05 M ve 0.5 M'lık ara stok solüsyonlardan 20 µl eklenerek, CDME'nin final konsantrasyonunun sırasıyla 0.5 mM ve 5 mM olması sağlanmış oldu. Hücreler CDME ile 24 saat boyunca 37 °C'lik inkübatörde bekletildi.

3.gün: RWPE-1, PC-3 ve LNCaP hücreleri, spesifik kültür medyumları içerisinde hücre toplayıcı yardımıyla kültür kaplarından ependorflara aktarıldı. 10000 x g'de 15 dakika santrifüj işlemi sonucunda elde edilen hücre peletinin üzerine, RNaz-A içeren 300 µl lizis tamponu eklendi. Bu şekilde 37 °C'de 2 saat boyunca inkübe edilen hücrelere, final konsantrasyonu 0.5 mg/ml olacak şekilde proteinaz-K eklendi ve 56 °C'de 1 saatlik inkübasyona bırakıldı. Daha sonra ise, 1 M NaCl eklenerek hücreler, +4 °C'de gece boyunca inkübe edildi.

4.gün: Gece boyu inkübasyonun ardından 10000 x g'de ve +4 °C'de 30 dakika boyunca santrifüj edilen numunelere ait supernatantlar temiz tüplere aktarıldı. Supernatana 50 mM Na-asetat'tan 100 µl eklendikten sonra supernatanın iki katı kadar hacimde %95'lik etanol eklendi. Yine 10000 x g ve +4 °C'de 30 dakikalık santrifüj sonucunda elde edilen hücre peletleri, 5 dakika oda ısısında kurumaya bırakıldı. Daha sonra peletler, 12 µl 1X Tris-EDTA tamponu ile resüspanse edildi ve 37 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Son olarak numuneler, %1.5 agaroz jele yüklendi ve 1X Tris-EDTA tamponu varlığında yatay elektroforeze tabi tutuldu. 5V ile başlayan elektroforez işlemi 2 saat sonra 100V'a artırıldı ve elektroforez sonunda jel UV ışık altında görüntülendi.

3.6. PKCδ ve PKCε'nun Immunoblot Analizi ile Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi

3.6.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Kullanılan Solüsyonlar:

- Hücre lizis tamponu: Promega (Madison, WI, USA) firmasından temin edilen 5X lizis tamponu, kullanım sırasında distile su ile 1X'e dilüe edildi.
- Proteaz inhibitör kokteyl tabletleri: Roche (Branchburg, NJ, USA) firmasından temin edildi. Her bir tablet, 10 ml lizis tamponuna eklenerek kullanıldı.

CDME'nin hazırlanması: Western Blot analizinde hücrelerin CDME ile muamele edilmesi için 1 M ve 0.1 M olmak üzere iki farklı CDME stok solüsyonu taze olarak hazırlandı.

Prosedür:

- RWPE-1, PC-3 ve LNCaP hücreleri, tripsin-EDTA yardımıyla buldukları flaskın yüzeyinden kaldırıldı ve 100mm çapındaki steril kültür petri kaplarına aktarıldı. Hücreler, %80 yoğunluğa gelinceye kadar rutin olarak beslendi. Daha sonra CDME muamelesi için ilgili petrilere 0.1 M ve 1M'lık stok solüsyonlardan 40 µl eklendi ve böylece 8 ml medyum bulunan petrideki CDME'nin final konsantrasyonun sırasıyla 0.5 mM ve 5 mM olması sağlandı. Hücreler CDME ile 1.5 saat boyunca 37 °C'lik inkübatörde bekletildi.
- Süre sonunda 1 kez 1X PBS ile yıkanan hücreler, 100 µl lizis tamponu içerisinde hücre toplayıcı yardımıyla petrilere alınarak sonikasyon yoluyla parçalandı. 10000 x g ve 4 °C'de 5 dakika santrifüj sonucunda elde edilen supernatant temiz bir tüpe aktarıldı. Immunoblotlama aşamasında her numuneden eşit miktarda proteinin yüklenebilmesi için, supernatandaki protein miktarı kuantifiye edildi ve bu numuneler immunoblot analizi için kullanıldı.

3.6.2. Protein Miktar Tayini

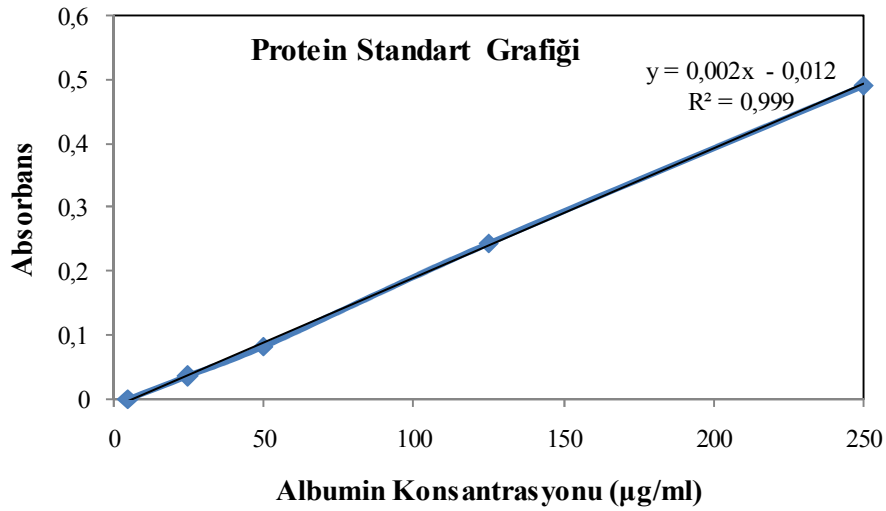
Prensip: Bikinkonik asit (BCA) aracılığıyla yapılan protein tayini, alkali şartlarda Cu^{2+} nin proteinlerle kompleks oluşturarak Cu^{1+} e indirgenmesi ve sonrasında da BCA ile kompleks oluşturması prensibine dayanır. Oluşan bu kompleksin absorbansı, 562nm dalga boyunda ölçülerek, standartlar varlığında köre karşı protein miktar tayini yapılır [127].



Kullanılan Kit: BioRad'dan (Hercules, CA, USA) temin edilen BCA protein tayin kiti kullanıldı. Standart olarak, kit içerisinde verilen farklı konsantrasyonlardaki kullanıma hazır albümin solüsyonları kullanıldı.

Prosedür:

- Deneysel prosedürü olarak, kit üretici firma tarafından önerilen protokol uygulandı.
- Numunelerdeki protein miktarı, 5, 25, 50, 125 ve 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olmak üzere 5 farklı albümin standardının kullanıldığı standart grafiğe göre hesaplanarak tayin edildi. Standart grafiği olarak, her bir ölçüm ile eş zamanlı olarak elde edilen anlık grafikler kullanıldı ve R^2 değeri 0.95'in üzerinde olan grafikler kabul edildi. Buna bir örnek olarak aşağıdaki grafik verildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. BCA yöntemine göre elde edilen protein standart grafiği.

3.6.3. PKC δ ve PKC ϵ 'nin Immunoblot Analizi

Prezips: Nontümörjenik (RWPE-1) ve tümörjenik (PC-3 ve LNCaP) prostat hücrelerinde CDME muamelesi sonrasında oluşan PKC δ ve PKC ϵ 'nin protein ekspresyonundaki değişiklikler immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir. Bu yöntem, elektriksel ortamda molekül ağırlıklarına göre jelde ayrılan proteinlerin, membrana aktararak önce spesifik antikorları ile sonra da bunu tanıyan ve belirli bir substrat ile reaksiyon verebilen ikincil bir antikora ile bağlanması sonucu oluşan yanıtın filmde gösterilmesi prensibine dayanmaktadır. Bu amaçla proteinler önce SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrışmalı, sonra ilgili primer antikoru ile blotlanmalıdır.

Kullanılan Kit ve Solüsyonlar:

- Ayrışma jeli tamponu (Resolving Buffer): 1.5 M Tris (pH 8.8) + 14 mM SDS
9.085 g Tris, 50 ml distile suda çözündü. HCl ile pH 8.8'e ayarlanan tampona 0.2 g SDS eklenerek solüsyon hazırlandı.
- Yükleme jeli tamponu (Stacking Buffer): 0.5 M Tris (pH 6.8) + 14 mM SDS
3.025 g Tris, 50 ml distile suda çözündü. HCl ile pH 6.8'e ayarlanan tampona 0.2 g SDS eklenerek solüsyon hazırlandı.
- Akrilamid – Bisakrilamid Solüsyonu: %40 oranında kullanıma hazır olarak BioRad'dan (Hercules, CA, USA) temin edildi.
- %10 Amonyum persülfat (APS): 0.1 g amonyum persülfat 1 ml distile suda çözünerek hazırlandı.
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamin): Akrilamid ve bisakrilamidin polimerizasyonunu katalizlemesi amacıyla kullanılan Temed solüsyonu, kullanıma hazır olarak Merck'den (Darmstadt, Germany) temin edildi.
- Yükleme Tamponu (Loading Dye): 2X olarak BioRad'dan (Hercules, CA, USA) kullanıma hazır olarak temin edildi. Tamponun içeriğinde; %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-merkaptotanol, %0.004 bromfenol mavisi ve 0.125 M Tris-HCl (pH:6.8) bulunur.
- Elektroforez Tamponu (Running Buffer): 5X stok olarak hazırlandı.
15 gr Tris, 72 gr Glisin ve 5 g SDS tartılıp 1L distile suda çözündü. Kullanım aşamasında ise 5X'lik bu stok solüsyon, distile su ile 1X'e dilüe edildi.
- Blotlama Tamponu (Blotting Buffer): 10X stok olarak hazırlandı.
30.3 g Tris, 144 g Glisin ve 10 g EDTA tartılıp 1L distile suda çözündü. Kullanım aşamasında ise 10X'lik bu stok solüsyon %20 metanol ile 1X'e dilüe edildi. Merck'den (Darmstadt, Germany) temin edilen metanol, transfer sırasında membranın şişmesi ve ayrılan proteinlerin korunabilmesi amacıyla blotlama tamponuna eklendi.

- PBS-T (%0.1 Tween 20): 10X stok PBS solüsyonu hazırlandı. 87.6 g NaCl, 2.76 g NaH₂PO₄ (monobazik), 11.36 g Na₂HPO₄ (dibazik), 1.87 KCl tartılıp 1L distile suda çözünür. Hazırlanan bu 10X'lik stok solüsyon, kullanılmadan önce distile su ile 1X'e dilüe edilir ve 1L için 1 ml Tween-20 eklenerek PBS-T solüsyonu hazırlanmış olur.
- %5 Bloklama Solüsyonu: 1 g yağsız süt tozu, 20 ml TBS-T içerisinde taze olarak hazırlanır.
- PKC δ ve PKC ϵ primer antikör (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) solüsyonları: 1:1000 oranında PBS-T içerisinde taze olarak hazırlandı. Her iki antikör de anti-rabbit, poliklonal karaktere sahiptir.
- Sekonder Antikör (Chemicon Int., Temecula, CA, USA) Solüsyonu: Floresans işaretli anti-rabbit sekonder antikörü, 1:7000 oranında PBS-T içerisinde taze olarak hazırlandı.

Prosedür:

SDS-PAGE Elektrofözezi

- Elektrofözezi, iki fazlı akrilamid jel üzerinde gerçekleştirildi. Bu amaçla %10'luk ayırıştırma jeli ve % 5'lik yükleme jeli, Tablo 3.1' de belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 3.1. Ayırıştırma ve yükleme jellerinin hazırlanması

		Ayırıştırma Jeli (%10)	Yükleme Jeli (%5)
Distile Su		2.45 ml	3.1 ml
Tris-HCl tamponu	pH 8.8	1.25 ml	-
	pH 6.8	-	1.25 ml
Akrilamid/Bisakrilamid		1.25 ml	0.625 ml
%10 APS		0.05 ml	0.05 ml
Temed		0.002 ml	0.005 ml

- %70'lik alkol ile temizlenen cam plakalar, jelin döküleceği standlara yerleştirilip plakalar arasına önce ayırıştırma jeli arkasından yükleme jeli döküldü ve oda ısısında sırasıyla 50 ve 20 dakika süreyle donmaya bırakıldı.
- Protein miktarları BCA yöntemiyle önceden tayin edilen numuneler, her bir kuyucukta 35 μ g olacak şekilde, 2X yükleme tamponu ile 1:1 oranında dilüe edildi. Bu aşamada ilgili tüplere final konsantrasyonu 30mM olacak şekilde DTT eklendi. Hazırlanan numuneler 95 ⁰C'lik termoblok içerisinde 8 dakika inkübe

edildi. İlk kuyucuğa molekül ağırlıkları bilinen proteinlerden oluşan markır, diğerlerine de numuneler jele yüklenerek elektroforez başlatıldı. 1X Elektroforez tamponu varlığında, numunelerin ayrıştırma jeline kadar aynı anda toplanabilmesi için akım önce 80 V'a, daha sonra asıl ayrışmanın olması için 120 V'a ayarlanarak elektroforez işlemi gerçekleşti.

Immunoblotlama:

- Elektroforez sonunda cam plakaların arasından alınan jel, 1X transfer tamponu içerisinde nitroselülöz membran ile sandviçlendi. Bu amaçla kullanılacak olan nitroselülöz membran, süngerler ve filtre kağıtları soğuk 1X transfer tamponu ile önceden doyuruldu. Sandviç için, katottan anota doğru sırasıyla sünger, whatmann kağıdı, jel, nitroselülöz membran, whatmann kağıdı ve sünger sandviç aparatı içerisinde üst üste yerleştirildi ve aparat sıkıca kapatıldı. Hazırlanan sandviçin anot kutbunun anotta, katot kutbunun da katotta olmasına dikkat edilerek transfer tankına yerleştirildi. Transfer işlemi 1X transfer tamponu içerisinde +4 °C ve 30 V'da, 1 saatte süresince gerçekleşti.
- Transfer sonucunda sandviç aparatının içinden alınan membran, önce non-spesifik bağlanmaların engellenmesi amacıyla %5'lik bloklama solüsyonu ile oda ısısında 1 saat, daha sonra PKCδ veya PKCε'ya spesifik primer antikor ile +4 °C'de gece boyunca, son olarak ise floresan işaretli sekonder antikor ile oda ısısında 3 saat süresince inkübe edildi.

Görüntüleme:

- Floresan olarak işaretlenmiş olan membrandaki bantlar, Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biotechnology, Lincoln, Nebraska, USA) aracılığıyla görüntülendi.

Bantların yoğunluğu: Image J – Versiyon 1.36 (National Institute of Health, Maryland, USA) dansitometre programı ile kuantifiye edilmiştir.

3.7. PKCδ ve PKCε'nun Immunpresipitasyonu ve Enzim Aktivitesi Ölçümü

3.7.1. Immunpresipitasyon

Prensip: Lizis tamponu içerisinde hücreden ekstrakte edilen proteinlere, immun kompleksin oluşmasına izin vermek amacıyla spesifik antikorlar eklenmesi ve daha sonra da oluşan bu immun kompleksin Protein A veya G içeren katı faza bağlanması prensibine dayanmaktadır. Protein A (veya G)-antikor interaksyonu oluştuktan sonra bağlanmamış proteinler ise, katı fazın yıkanmasıyla uzaklaştırılır.

Kullanılan Kit ve Solüsyonlar:

Lizis Tamponu: 10mM Tris [pH 7.4], 1mM EDTA, 1% gliserol, 1µg/ml leupeptin, 1µg/ml pepstatin, 50µg/ml aprotinin, 0.5mmol/L fenilmetilsülfonil florid (PMSF)

Prosedür:**1.Gün:**

- Herbir RWPE-1, LNCaP ve PC3 hücre dizisi; 2 adet kontrol, 2 adet kontrol+30 mM DTT, 2 adet 0.5 mM CDME, 2 adet 0.5 mM CDME+30 mM DTT, 2 adet 5 mM CDME ve 2 adet 5 mM CDME+30 mM DTT olmak üzere toplam 12'şer adet 100mm kültür kapları içerisinde tam yoğunluğa ulaşana kadar uygun medyumları içerisinde çoğaltıldı. İlgili kültür kaplarına final konsantrasyonları 0.5 mM ve 5 mM olacak şekilde CDME eklendi ve bu şekilde hücreler, 1.5 saat inkübatörde bekletildi.
- Aynı şekilde muamele edilmiş iki eş kültür kaplarındaki hücreler, lizis tamponu (500µl/kültür kabı) içerisinde bir eppendorf tüpte birleştirildi ve 30 saniye süresince sonikasyon ile parçalanarak +4⁰C'de, 600 x g'de, 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen supernatandan BCA yöntemiyle protein miktarı tayin edildi.
- Eşit miktarda protein içerecek şekilde ayarlanan numunelere, PKCδ veya PKCε primer antikorları (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 1:100 oranında ilave edildi. Antijen-antikor kompleksinin oluşmasına izin vermek amacıyla karışım, +4 ⁰C'de, sürekli alt-üst rotasyonu eşliğinde gece boyunca inkübe edildi.

2.Gün:

- Herbir eppendorf tüpe, 30 µl Protein G+A agaroz süspansiyonu (Calbiochem, San Diego, CA, USA) eklendi.
- Antijen-antikor immun kompleksinin, ProteinG+A agaroz boncuklarına bağlanabilmesi için karışım, +4 ⁰C'de, sürekli alt-üst rotasyonu eşliğinde 2 saat süresince inkübe edildi.
- 1000 x g ve +4 ⁰C'de, 5 dakika süresince yapılan santrifüj sonunda elde edilen hücre peletine 500 µl lizis tamponu eklenerek yine aynı şartlarda santrifüj edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı, böylece bağlanmayan proteinlerin ortamdan uzaklaşması sağlandı. En son yapılan santrifüjle elde edilen pelete 20 µl PBS eklenerek pelet, resüspanse edilir. Bu peletin bir kısmı immunpresipitasyonun doğruluğunun kanıtlanması ve enzim aktivite sonuçlarının hesaplanması amacıyla western blot analizinde, geri kalan kısmı ise PKC enzim aktivite ölçümünde kullanıldı.

3.7.2. PKC δ ve PKC ϵ Enzim Aktivitesi

Prensip: PKC için spesifitesi yüksek olan fluoresan peptid substratının (C1 peptide-PLSRTLSTVAAK), PKC tarafından fosforile edilmesi sonucunda net yükünün +1'den -1'e değişmesi ve net yükteki bu değişikliğin de nötral pH'daki agaroz jel üzerinde görüntülenmesi prensibine dayanır. Dolayısıyla jel üzerinde, substratın fosforile ve non-fosforile formları ayrılarak PKC enzim aktivitesi tespiti yapılır.

Kullanılan kit ve Solüsyonlar: PepTag Non-Radyoaktif Protein Kinaz Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA) kullanılmıştır. Kit, genel PKC enzim aktivitesini ölçtüğü için spesifik olarak PKC δ ve PKC ϵ enzim aktivitelerinin ölçümünde, bir önceki aşamada immunpresipitasyon ile elde edilen suspansiyonlar kullanıldı.

Prosedür:

- Numune, pozitif ve negatif kontrol tüpleri Tablo 3.2.'de belirtildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3.2. PKC enzim aktivite ölçümü için numune, pozitif ve negatif kontrol tüplerinin hazırlanması

	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	Numune
5X PKC Reaksiyon Tamponu	5 μ l	5 μ l	5 μ l
C1 Peptid	5 μ l	5 μ l	5 μ l
5X PKC Aktivatör Solüsyonu	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Peptid Koruma Solüsyonu	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Steril Distile Su	5 μ l	9 μ l	-
Tüm tüpler 30 ⁰ C'de 2 dakika süresinde inkübe edildi			
PKC	4 μ l	-	-
Numune	-	-	9 μ l

- Tüm tüpler 30⁰C'de, 30 dakika sürekli rotasyon eşliğinde inkübe edildi. Ayrıca bu aşamada DTT ile muamele edilecek olan numune tüplerine 1M'lık stok DTT solüsyonundan 0.75 μ l (final konsantrasyon 30 mM) eklendi.
- Reaksiyonu durdurmak amacıyla tüm tüpler, 95⁰C'de 10 dakika inkübe edildi.

- Pozitif kontrol, negatif kontrol ve tüm numuneler, 50mM Tris-HCl (pH:8.0) tamponu içerisinde %0.8'lik agaroz jelde, 100V'da, 20-25 dakika elektroforeze tabi tutuldular.

3.8. PKC δ Gen Ekspresyonunun küçük interferans RNA (siRNA) ile İnhibisyonu

Prensip: 20-21 nükleotidlik dizilimler olan siRNA'lar, spesifik olarak bağlandığı mRNA'yı degrade ederek ilgili proteinin translasyonunu engellerler. Bu bilgi ışığında, PKC δ mRNA'sına spesifik antisens siRNA aracıyla PKC δ 'nın protein sentezinin inhibisyonu amaçlandı.

Kullanılan Kimyasallar:

- PKC δ siRNA dizilimi: sense 5' GGU GUU GAU GUC UGU UCA Gtt 3'
Antisense 5' CUG AAC AGA CAU CAA CAC Ctt 3'

PKC δ ve negatif kontrol siRNA'lar, Ambion'dan (Austin, TX, USA) temin edilmiştir.

- Oligofektamin: siRNA'ların memeli hücrelerine aktarılmasında kullanılan madde, Invitrogen'den (Carlsbad, CA, USA) temin edildi.

Prosedür:

- RWPE-1 ve PC3 hücreleri, PKC δ ve negatif kontrol siRNA'lar ile ayrı ayrı transfekte edilmesi amacıyla her bir kuyucukta %50 yoğunluğa sahip olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür kaplarına aktarıldı.
- Tüp I ve tüp II olmak üzere iki farklı içerik hazırlandı.
TÜP I: 3 μ l stok oligofektamin + 12 μ l serumsuz medyum
TÜP II: 20 μ M stok siRNA suspansiyonundan 10 μ l + 165 μ l serumsuz medyum
- Tüp I, tüp II'e eklenerek karışım oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. Süre sonunda bu karışım, daha önce hazırlanan 6 kuyucuklu kültür kabında bulunan hücrelerin üzerine eklenerek 6 saat inkübatörde bekletildi.
- 6 saat sonrasında hücrelerin üzerine 3X serumlu medyum eklenerek 48 saat kültür şartlarında inkübasyona bırakıldı.
- Transfekte edilen hücrelerde transfeksiyonun doğruluğunun kanıtlanması amacıyla ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) deneyi ve takibinde hücre canlılığının tayin edilmesi amacıyla tripan-mavi deneyi yapıldı.

3.9. PKC δ Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile Analizi

Prencip: Kalıp olarak kullanılan RNA'nın ters transkriptaz enzimi ile komplementer DNA'ya çevrilmesi ve takibinde de bu DNA üzerinden hedef gene spesifik dizilimlerin çoğaltılması prensibine dayanır.

Kullanılan Kit ve Solüsyonlar:

- Trizol Reaktifi, SuperScript III cDNA sentez kiti ve Platinyum Taq DNA polimeraz kiti, Invitrogen'den (Carlsbad, CA, USA) temin edildi.
- 1-bromo-3-kloropropan (BCP), izopropanol ve etanol Sigma'dan (St.Louis, MO, USA) temin edildi.
- PKC δ için spesifik primer dizilimi:
sense 5' AGA GGA GCC AGT GTC TGA GGT GA 3'
antisense 5' TGA AGC GGT GCG GCA TGT C 3'

PKC δ için spesifik primer diziliminin dizayn edilmesi için, önce <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> sitesinden PKC δ genlerine spesifik mRNA dizilimleri saptandı. Daha sonra genel primer dizayn kuralları göz önüne alınarak olası primerler seçildi. Seçilen primer dizilimlerinin, herhangi bir dimer oluşturup oluşturmadığı veya diğer genlere ait dizilimler ile çakışıp çakışmadığını kontrol etmek için ise <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html> sitesinden yararlanıldı.

3.9.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu

Prosedür:

- 6 kuyucuklu kültür kaplarında bulunan hücrelere 1ml/kuyu trizol reaktif eklendi. Oda ısısında 5 dakika inkübasyonu takiben, 100 μ l BCP ekledi ve 12000 x g'de, 4 $^{\circ}$ C'de, 15 dakika santrifüj edildi.
- En altta protein, ortada DNA ve en üstte RNA olmak üzere 3 faza ayrılan süspansiyonun, en üst renksiz fazı temiz bir tüpe aktarılarak üzerine 500 μ l izopropanol eklendi. 12000 x g'de, 4 $^{\circ}$ C'de, 8 dakika santrifüj işlemini takiben elde edilen pelete %75'lik etanol eklenerek karışım, 7500 x g'de, 4 $^{\circ}$ C'de, 5 dakika santrifüj edildi.
- Elde edilen RNA peleti, RNaz içermeyen su ile resüspanse edildi ve çözünmesi için 58 $^{\circ}$ C'de, 10 dakika inkübe edildi.

- Spektrofotometrede önce 260 nm’de RNA miktarı, daha sonra da 260nm/280nm’de RNA’nın saflığı tayin edildi. 260nm/280nm oranı, 2’den büyük olan RNA numuneleri RT-PCR analizinde kullanıldı.

3.9.2. RT-PCR Analizi

Prosedür:

- RT-PCR analizi için 1µg RNA örneği kullanıldı.
- Hem cDNA sentezi için hem de PCR analizi için, kit üreticisi tarafından önerilen prosedür uygulandı.
- PKCδ gen amplifikasyonu için aşağıdaki PCR programı kullanıldı.
 - 94°C’de 2 dakika
 - 94°C’de 30 saniye
 - 55°C’de 30 saniye
 - 72°C’de 1 dakika
 - 72°C’de 5 dakika35 döngü
- Elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri, yükleme tamponu ile dilüe edilerek %2’lik agaroz jel üzerinde ve 1X Tris-Borat-EDTA tamponu (pH:8.3) varlığında 30-35 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Marker olarak DNA ladder 100bp kullanıldı.

3.10. Tripan Mavi ile Hücre Canlılığının Tespiti

Prensip: Hücre süspansiyonunda bulunan canlı hücrelerin sayısının tespit edilmesi amacıyla yapılan bu test, canlı hücrelerin tripan mavi boyasını kabul etmeyerek boyanmamış veya beyaz görünmesi, buna karşılık ölü hücrelerin de boyanmasını içerir. Bir asit boyası olan tripan mavi solüsyonu, iki tane azo kromofor içermesinden dolayı negatif yüküdür. Bu nedenle membran herhangi bir hasara uğramadıkça hücre ile etkileşime girmez.

Kullanılan Solüsyon: %0.4 (w/v) tripan mavi solüsyonu, Sigma’dan (St.Louis, MO, USA) kullanıma hazır olarak temin edildi.

Prosedür:

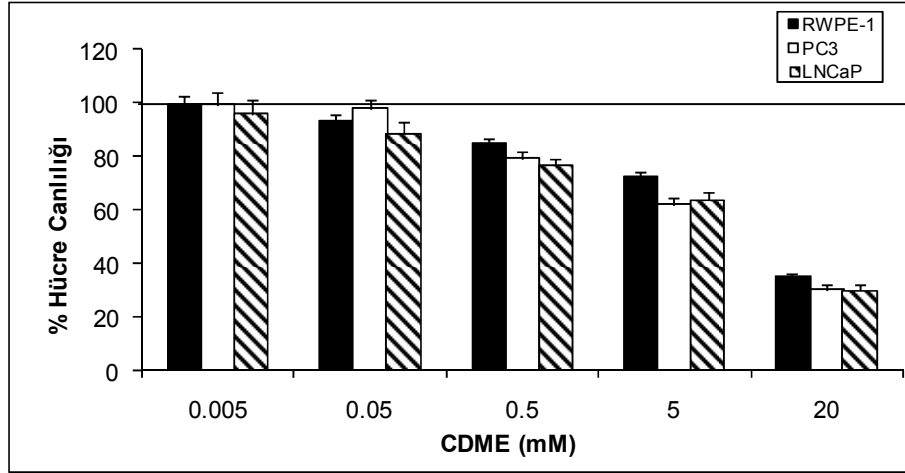
- PKCδ veya negatif kontrol siRNA’lar ile transfekte edilmiş ve herhangi bir transfeksiyona maruz kalmamış RWPE-1 ve PC3 hücreleri, her bir kuyucukta 4000 hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu kültür kaplarına ayrıştırıldı.

- Kültür kaplarına ayrıştırılan hücrelerin yüzeye yapışmaları için gece boyunca inkübatörde bekletilmesinin ardından, ilgili kuyucuklara 0.5 mM CDME eklenerek hücreler 1.5 saat kültür şartlarında inkübe edildiler.
- Tripsin yardımıyla kuyucuklardan toplanan hücreler, yeni bir tüpe aktarıldılar ve 1500 x g'de 5 dakika santrifüj edildiler. Elde edilen hücre peletine tripan mavi solüsyonu eklenerek hücre sayımı yapıldı.

BULGULAR

4.1. Hücre Sitotoksosite Ölçümü

Çalışmanın ileri deneylerinde kullanılacak en uygun iki CDME dozunun saptanması amacıyla yapılan hücre sitotoksosite ölçümü için hücreler, 0.005mM, 0.05mM, 0.5mM, 5mM ve 20mM olmak üzere 5 farklı CDME dozu ile muamele edildiler. Sonuçlar, herhangi bir CDME muamelesinin olmadığı durumda elde edilen verilere oranlanarak % kontrol olarak değerlendirildi. Buna göre; 0.005mM ve 0.05mM CDME' nin her üç hücre dizisinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı gözlemlendi. Buna karşılık 0.5mM ve 5mM CDME'nin, hücre canlılığı üzerinde sırasıyla %20 ve %35 oranında inhibe edici etkiye sahip olduğu tespit edildi. 20mM CDME'nin ise ortalama %70 gibi büyük bir oranda canlılığı baskılayarak toksik bir etkiye sahip olduğu saptandı. CDME'nin uygulanan tüm dozlarında gözlenen hücresel yanıtlar kıyaslandığında prostat kanseri hücrelerinden androjen-bağımlı olan LNCaP'nin, androjen-bağımsız olan PC3'e göre CDME'ye daha fazla hassasiyetinin olduğu gözlemlendi. Oysa ki, kontrol hücresi olan RWPE-1'da ise bu hassasiyet en az düzeydedir (Şekil 4.1).

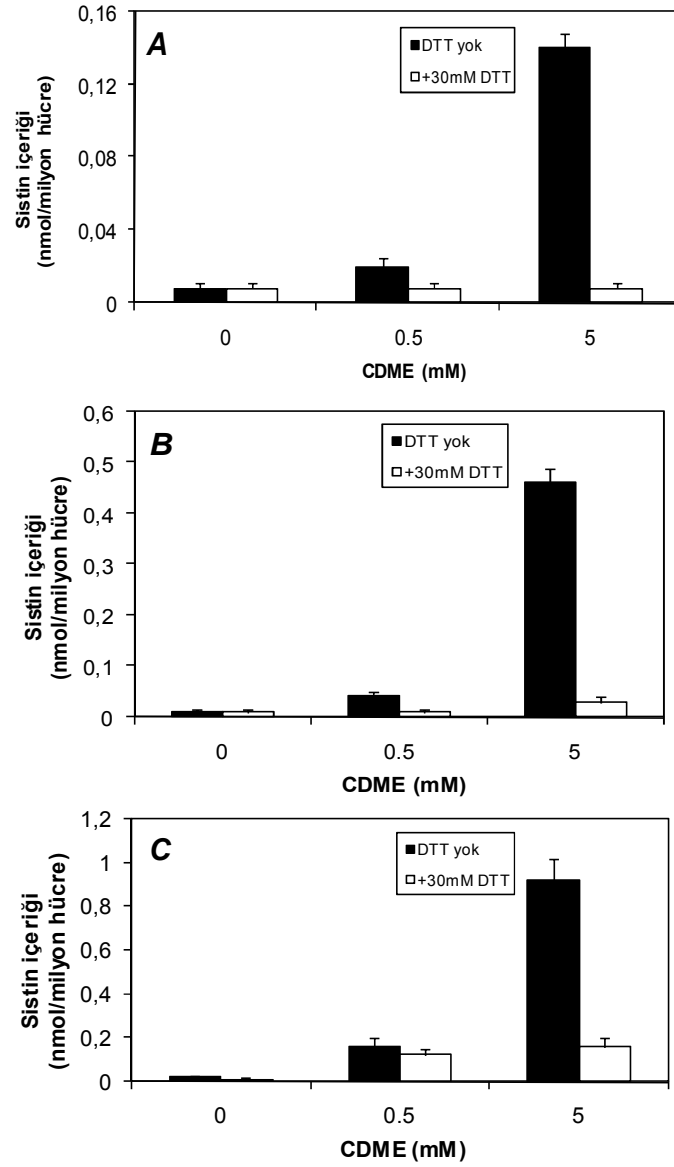


Şekil 4.1. 0.005mM, 0.05mM, 0.5mM, 5mM ve 20mM CDME dozlarının, RWPE-1, PC3 ve LNCaP hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkileri. %kontrol olarak verilen sonuçlar, birbirinden bağımsız üç deneyin ortalama \pm standart hata değerine karşılık gelir.

4.2. CBP Düzeyleri

Sistin metabolik bir öncüsü olan CDME'nin hücreye verilmesini takiben hücre içi sistin düzeylerindeki artışın dolaylı olarak gösterilmesi amacıyla yapılan CBP ölçümü RWPE-1 (Şekil 4.2A), PC3 (Şekil 4.2B) ve LNCaP (Şekil 4.2C) hücrelerinde CDME varlığında / yokluğunda gerçekleştirildi. Buna ilaveten ölçümler, CDME'nin etkilerini tersinir olarak kanıtlamak amacıyla disülfit bağlarını kıran DTT varlığında / yokluğunda da yapıldı. Deney sonucunda, hem kontrol hem de her iki prostat kanseri hücresinde hücre içi sistin konsantrasyonunun, yükselen CDME dozuna paralel olarak arttığı gözlemlendi. Buna karşılık tüm hücre dizilerinde CDME'e cevaben artan sistin düzeylerinin, 30mM DTT ile muamele sonucunda azaldığı gözlemlendi. Böylece DTT'nin tersinir olarak CDME etkilerini değiştirdiği saptandı.

CDME muamelesini takiben artan hücre içi CBP düzeyleri 3 farklı hücre dizisi arasında kıyaslandığında, kontrol hücredeki artışın her iki kanser hücresine oranla daha az olduğu açıkça gözlemlendi. CDME yokluğundaki duruma kıyaslandığında 0.5mM CDME ve 5mM CDME, RWPE-1'de sırasıyla 2.5 ve 17.5 kat hücre içi sistin düzeylerinde artışa neden olurken, bu oranlar LNCaP hücresinde sırasıyla 8 ve 46 kat diğer prostat kanser hücresi olan PC3'de ise 4 ve 45 kat olarak değişti. Bu sonuç, sitotoksikite sonuçları ile paralellik göstererek androjen-bağımlı LNCaP'nin, androjen-bağımsız PC3'e kıyasla CDME'e karşı daha hassas olduğunu açıkça gösterdi.

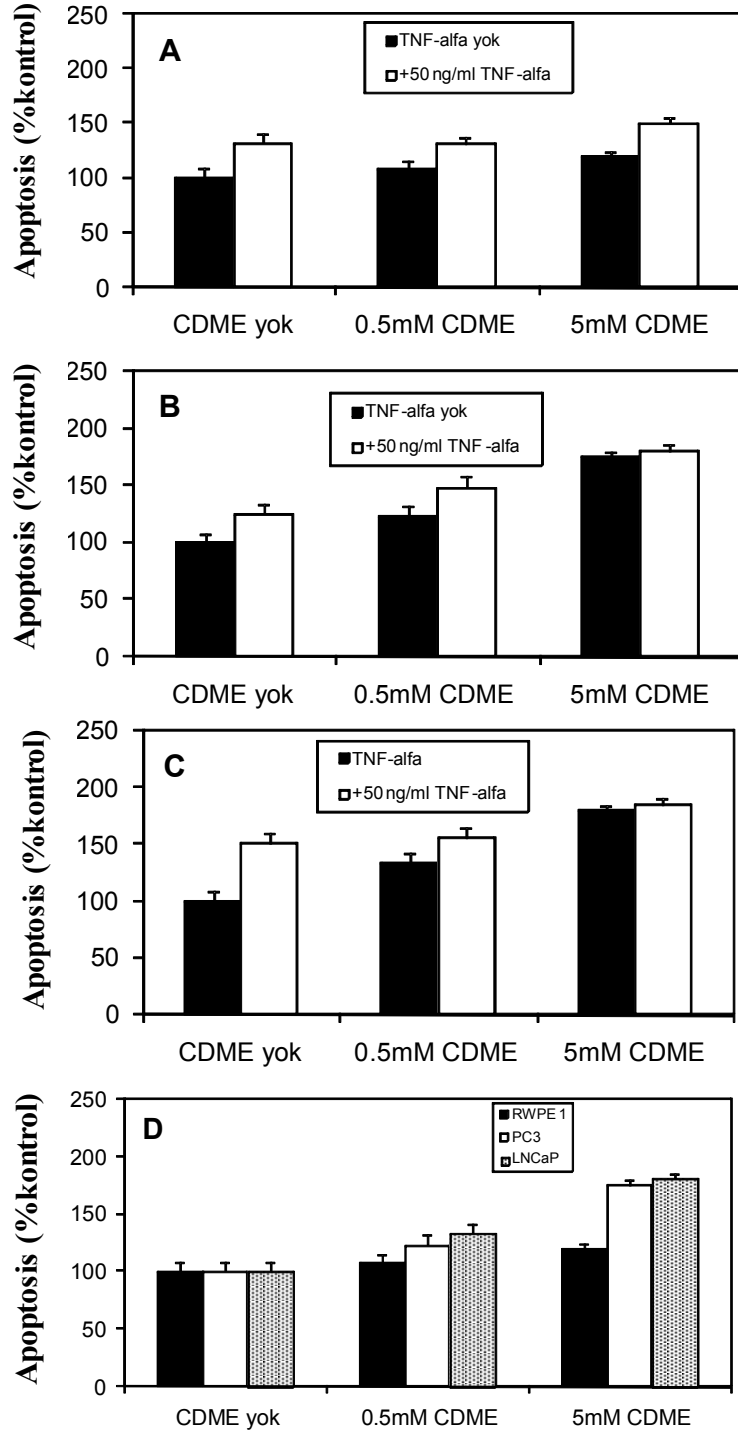


Şekil 4.2. 0.5mM ve 5mM CDME muamelesini takiben, RWPE-1’de (A), PC3’de (B) ve LNCaP’de (C) değişen hücre içi sistin düzeyleri. Grafikte verilen herbir sonuç, birbirinden bağımsız üç deneyin ortalama \pm standart hata değerine karşılık gelir.

4.3. Apoptozisin Değerlendirilmesi

Nontümörjenik prostat hücresi olan RWPE-1’de, androjen-bağımlı ve androjen-bağımsız prostat kanseri hücreleri olan sırasıyla LNCaP ve PC3’de, CDME muamelesine yanıt olarak değişen hücre ölüm oranları Kalsein AM aracılığıyla değerlendirildi. Önceki aşamalarda olduğu gibi hücreler, 0.5mM veya 5mM CDME varlığında / yokluğunda inkübe edildi. Ayrıca apoptozisi indüklemek amacıyla hücreler,

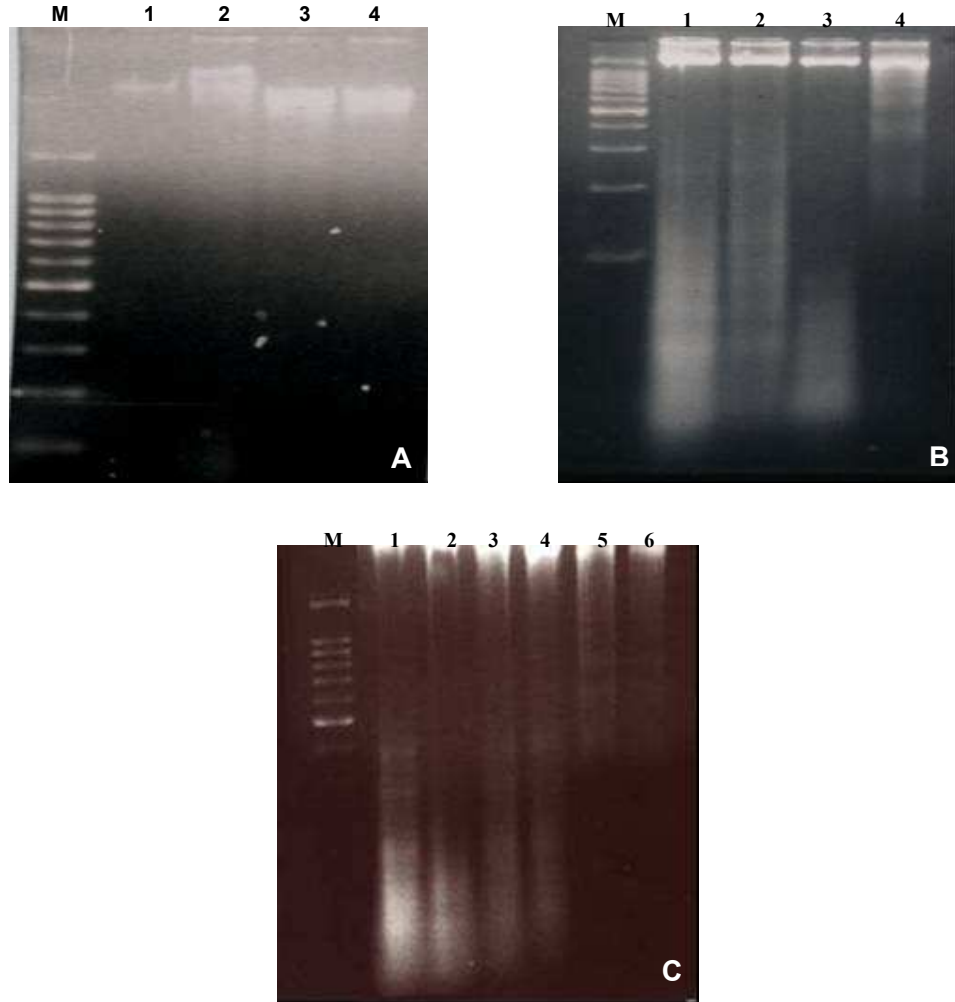
CDME'e ilaveten 50ng/ml TNF- α ile 18 saat süresince kültür şartlarında muamele edildi. Deney sonuçları, her bir hücrenin herhangi bir muameleye maruz bırakılmadığı koşullarda elde edilen değerlere kıyaslanarak, %kontrol olarak verildi. Ölçümler sonucunda hem nontümörijenik (Şekil 4.3A) hem de tümörijenik prostat hücreleri olan PC3 (Şekil 4.3B) ve LNCaP (Şekil 4.3C)'de CDME'nin, doz artışına paralel olarak hücrelerin apoptozisini indüklediği gözlemlendi. Ancak kanserli hücrelerdeki artış ile kontrol hücredeki kıyaslandığında, 0.5mM CDME muamelesi RWPE-1'da %8'lik bir apoptotik artışa neden olurken, LNCaP ve PC3'de bu oran sırasıyla %34 ve %23'dür. 5mM CDME muamelesi sonucunda ise bu artışlar arasındaki fark daha da derinleşerek RWPE-1'da %20, LNCaP ve PC3'de ise sırasıyla %81 ve %75 olarak ölçüldü (Şekil 4.3D). Bu oranlar CDME'nin her iki dozunun da, apoptozisi özellikle kanser hücrelerinde arttırdığını açıkça gösterdi. Buna ilaveten iki farklı prostat kanser hücrelerini kendi arasında karşılaştırdığımızda ise, LNCaP hücrelerinde saptanan apoptotik oranın PC3'e göre daha fazla olduğu gözlemlendi. Bu bulgu, daha önce yapılan hücre sitotoksikite ve hücre içi sistin ölçüm deneylerinin sonuçları ile paralellik göstererek LNCaP'nin PC3'e kıyasla CDME'e karşı çok daha hassas olduğu sonucuna varılmasına olanak verir. Ayrıca tüm hücrelerde ve tüm gruplarda 50ng/ml TNF- α 'nın da apoptozisi indüklediği gösterildi.



Şekil 4.3. 0.5mM ve 5mM CDME muamelesine yanıt olarak, RWPE-1 (A), PC3 (B) ve LNCaP (C) hücrelerinde değişen apoptotik oranların ayrı ayrı ve birbirleriyle kıyaslanarak (D) değişimi. %kontrol olarak verilen sonuçlar, birbirinden bağımsız üç deneyin ortalama \pm standart hata değerine karşılık gelir.

4.4. DNA Fragmantasyonunun Değerlendirilmesi

DNA fragmantasyonu, DNA'nın geri dönüşümsüz olarak hasara uğramasıyla ortaya çıkan bir sonuçtur. Eğer bir hücrenin DNA'sı ciddi hasarlanırsa, DNA tamir mekanizmaları tarafından onarılamaz ve sonuçta organizmadaki apoptotik mekanizmalar aracılığıyla hasarlı hücre yok edilir. Dolayısıyla, hücrelerin geri dönüşümsüz apoptoza girmesinin en önemli göstergelerinden biri DNA fragmantasyonudur. Deneyler, hem kontrol hem de her iki prostat kanseri hücresinde, hücrelerin CDME varlığında / yokluğunda 24 saat süresince inkübe edilerek gerçekleştirildi. Sonuçta, fragmantasyon kontrol hücrede CDME'nin hiçbir dozunda gözlenmezken (Şekil 4.4A), LNCaP (Şekil 4.4B) ve PC3 (Şekil 4.4C) hücrelerinde artan CDME dozuna paralel olarak DNA'nın parçalandığı belirgin bir şekilde gözlemlendi.



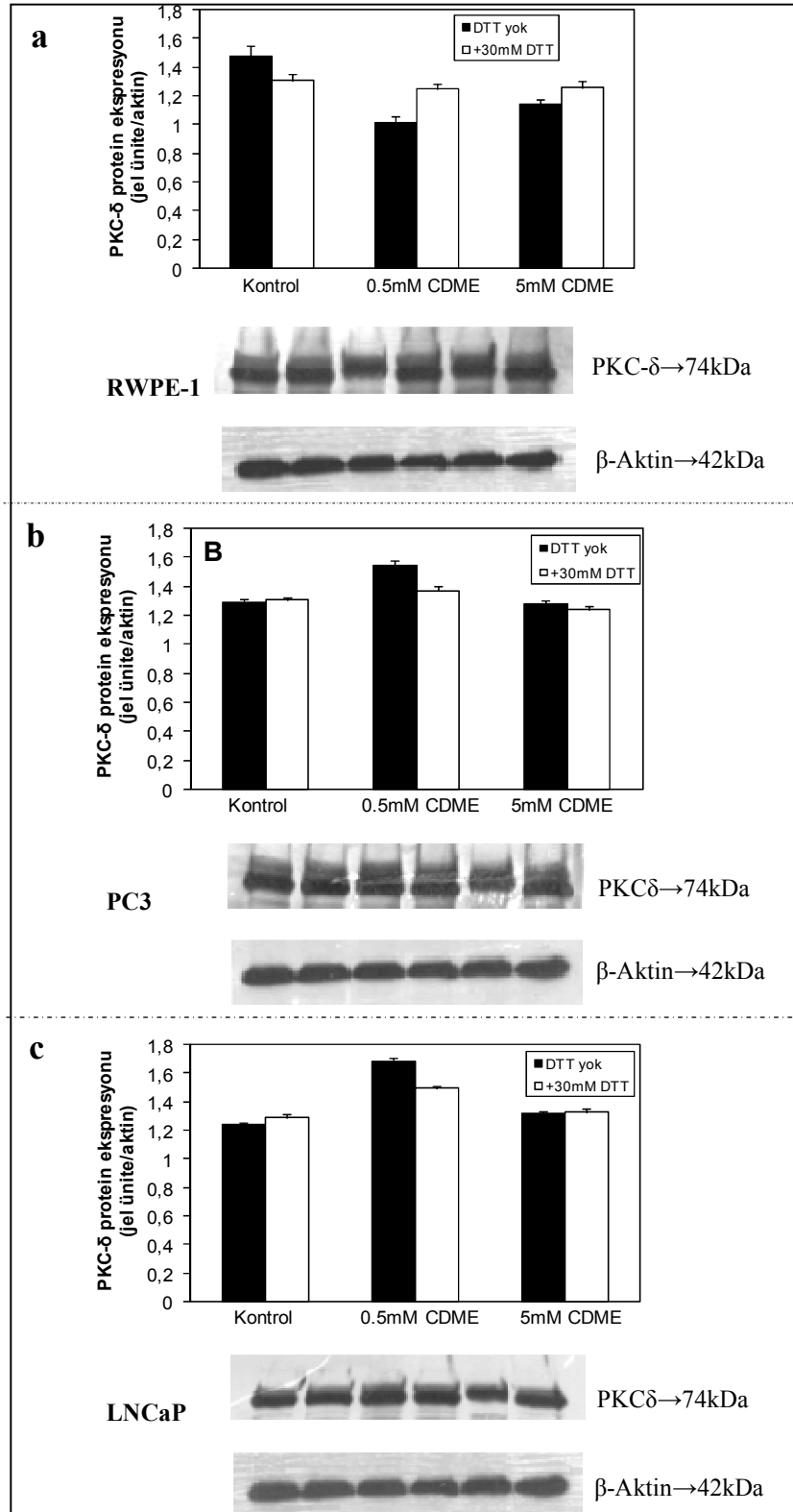
Şekil 4.4. RWPE-1 (A), LNCaP (B) ve PC3 (C) hücrelerinde CDME'nin DNA fragmantasyonu üzerine olan etkisi. A ve B için; 1: kontrol, 2: 0.5mM CDME, 3: 1mM CDME, 4: 5mM CDME. C için; 1: 1mM CDME, 2: kontrol, 3: 0.05mM CDME, 4: 0.5mM CDME, 5: 5mM CDME, 6: 10mM CDME. M: 100bp DNA ladder.

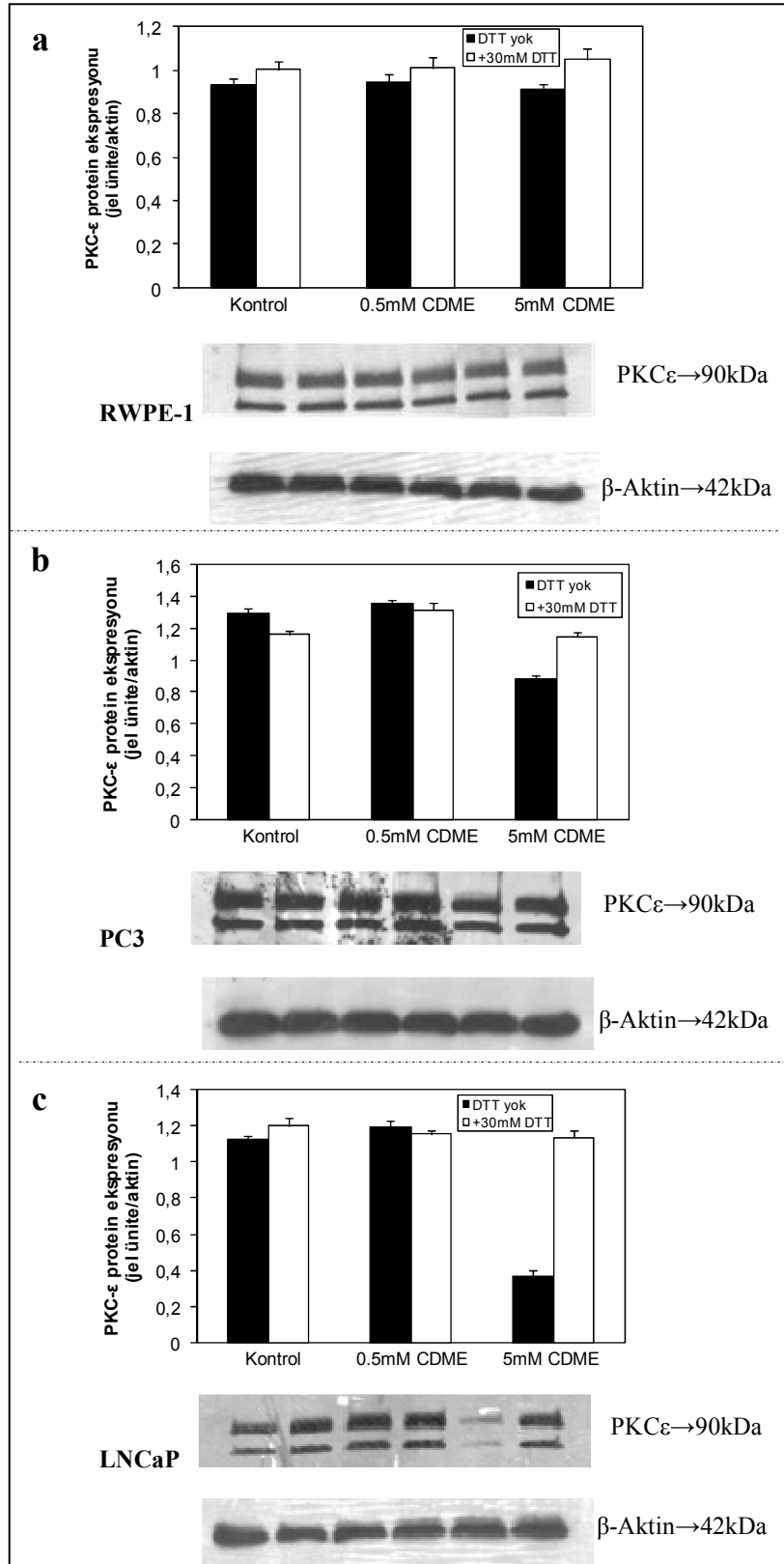
4.5. PKC δ ve PKC ϵ 'nin Protein Ekspresyon Düzeyleri

Nontümörijenik ve tümörijenik prostat hücrelerinde, CDME muamelesine cevaben PKC δ ve PKC ϵ 'nin protein ekspresyonlarındaki olası değişiklikler western blot analizi ile tayin edildi. Analiz sonucunda elde edilen veriler CDME'nin, bu iki proteinin ekspresyonları üzerinde zıt bir etkiye sahip olduğunu gösterdi. Hücreleri apoptoza götüren proapoptotik karakterde bir protein olan PKC δ 'nin ekspresyonunun CDME'e cevaben indüklendiği, onkojenik bir protein olan PKC ϵ 'nunkinin ise baskılandığı gözlemlendi. Ancak bu sonuç, CDME'nin dozuna bağlı olarak değişmektedir. Prostat kanseri hücrelerinin kendi kontrol şartları (CDME'nin uygulanmadığı durum) baz alındığında 0.5mM CDME'nin PKC δ ekspresyonunu, PC3'de %20 (Şekil 4.5A-b), LNCaP'de ise %35 (Şekil 4.5A-c) oranında arttırdığı saptandı. Bu önemli ve belirgin fark, PKC δ 'nin artışında LNCaP'nin CDME'e olan hassasiyetinin çok daha fazla etkin olduğu sonucuna varılmasına neden olur. 0.5 mM CDME-indüklü PKC δ ekspresyonu prostat kanseri hücrelerinde artmasına karşılık şaşırtıcı olarak kontrol hücrede %30 oranında azalmıştır (Şekil 4.5A-a). Apoptozisi indükleyen bir protein olan PKC δ 'nin kontrol hücrede azalması, kontrol hücrenin canlılığının sağlanması açısından oldukça önemlidir. 0.5mM CDME'e karşın 5mM CDME'nin, PKC δ ekspresyonunda her iki prostat kanser hücresinde de bu derece bariz bir etkiye sahip olmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak, proapoptotik-PKC δ 'nin protein ekspresyonunun artışındaki asıl etkin dozun 0.5mM CDME olduğu saptandı.

PKC ϵ 'nin western blot sonuçları analiz edildiğinde, yüksek onkojenik potansiyele sahip olan PKC ϵ 'nin protein ekspresyonlarının CDME muamelesi sonrasında kontrol hücrede değişmediği (Şekil 4.5B-a), ancak her iki prostat kanseri hücresinde belirgin biçimde CDME tarafından inhibe olduğu tespit edildi. CDME'nin, PKC ϵ 'nin ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etkileri, PKC δ üzerindeki uyarıcı etkileriyle tamamen zıttır. Ancak CDME'nin PKC ϵ üzerinde bu yöndeki etkisi, hücrelerin 5mM CDME ile muamele edildiği numunelerde saptandı. Buna göre, her bir hücrenin kendi kontrol şartları baz alınarak iki farklı prostat kanser hücresindeki PKC ϵ inhibisyon oranları kendi içerisinde karşılaştırıldığında, 5mM CDME'nin PC3'de %33'lük (Şekil 4.5B-b), LNCaP'de ise %68'lik (Şekil 4.5B-c) bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Görüldüğü gibi her iki oran da, PC3 ve LNCaP hücrelerindeki PKC δ ekspresyonundaki artış oranları ile paraleldir. Ancak PKC δ 'nin artışındaki bu etkinliğe 0.5mM CDME neden olurken, PKC ϵ 'nin azalışında ise 5mM CDME neden olmuştur.

CDME'nin tersinir etkilerini göstermek amacıyla hücrelerin ayrıca 30mM DTT ile muamelesi sonucunda, hem PKC δ hem de PKC ϵ protein ekspresyonlarında CDME'e cevaben gelişen değişikliklerin ortadan kalktığı gözlemlendi. Bu bulgular; hücre içi artan sistin içeriğinin, pro-oksidan şartlardan dolayı kanserde fonksiyonları değişen her iki PKC izozimine ait protein ekspresyonlarının S-sisteinilasyon mekanizması aracılığıyla regülasyonunda önemli bir rol oynadığı hipotezini desteklemektedir.

A

B

Şekil 4.5A. RWPE-1 (a) , PC3 (b) ve LNCaP (c) hücrelerinde, CDME'nin PKC δ protein ekspresyonları üzerine etkisi. %Kontrol olarak verilen sonuçlar, western blot ile elde edilen PKC δ protein bantları ve bunların Image J (NIH, Maryland, USA) dansitometre programı ile taranması sonucunda elde edilmiş olup birbirinden bağımsız üç deneyin ortalama \pm standart hata değerine karşılık gelir.

Şekil 4.5B. RWPE-1 (a) , PC3 (b) ve LNCaP (c) hücrelerinde, CDME'nin PKC ϵ protein ekspresyonları üzerine etkisi. %Kontrol olarak verilen sonuçlar, western blot ile elde edilen PKC ϵ protein bantları ve bunların Image J (NIH, Maryland, USA) dansitometre programı ile taranması sonucunda elde edilmiş olup birbirinden bağımsız üç deneyin ortalama \pm standart hata değerine karşılık gelir.

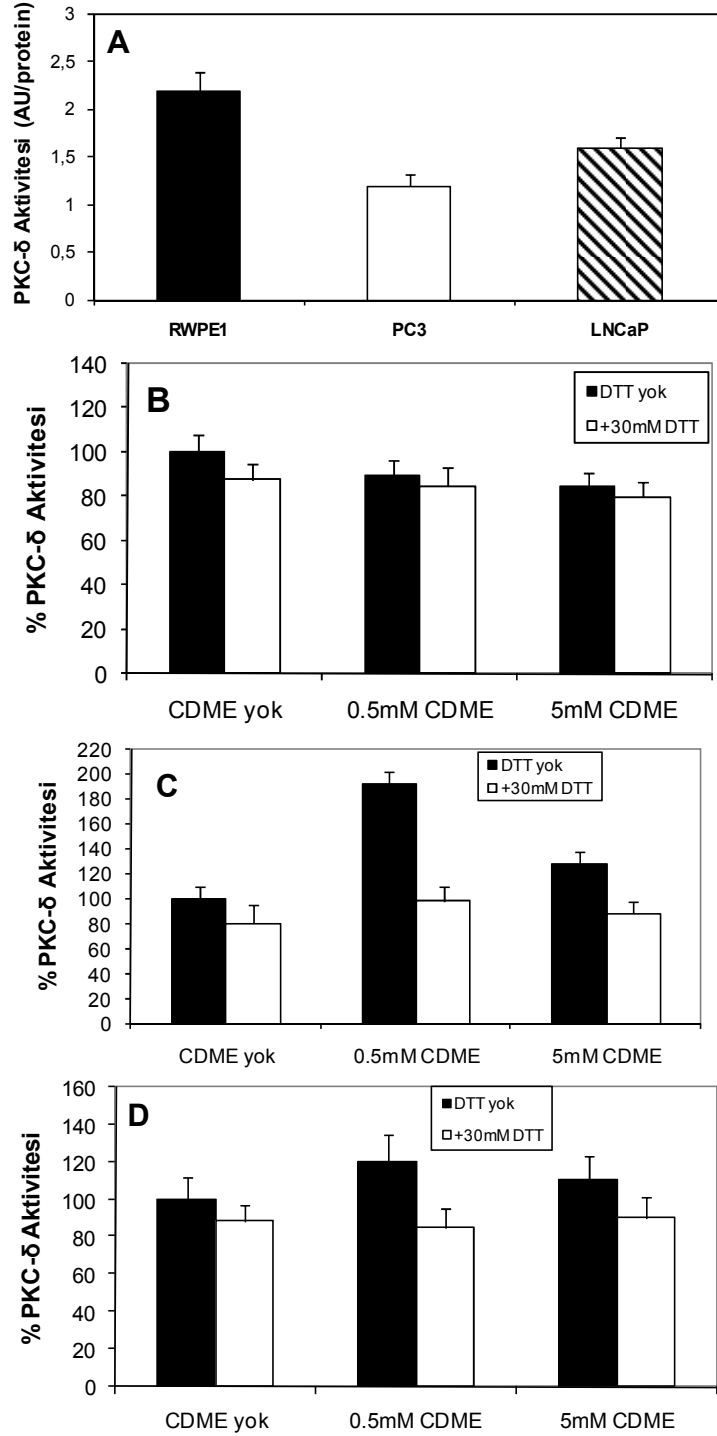
4.6. PKC δ ve PKC ϵ 'nin Enzim Aktivite Düzeyleri

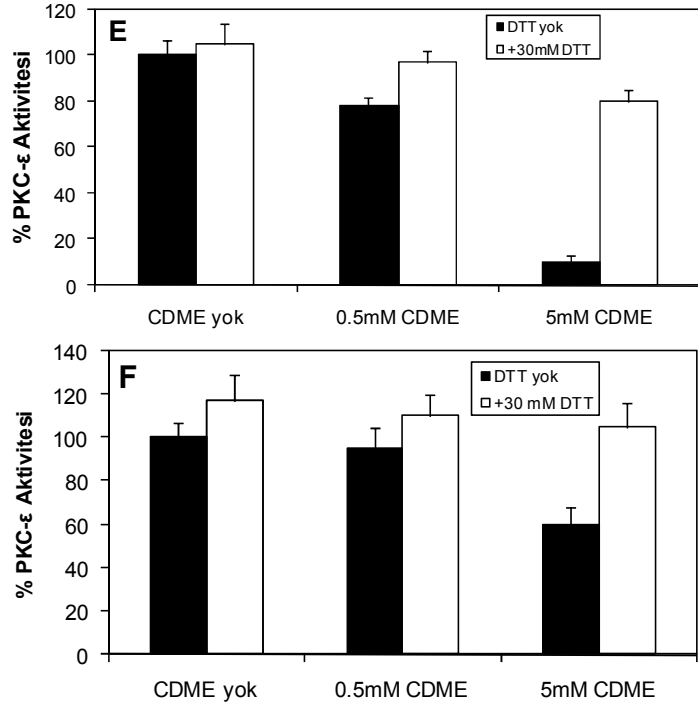
CDME'nin, PKC δ ve PKC ϵ aktivitesi üzerinde etkili olup olmadığını incelemek amacıyla, kontrol ve prostat kanser hücrelerinde her iki izozimin aktiviteleri ölçüldü. Ayrıca CDME'nin etkilerini tersinir olarak göstermesi amacıyla önceki deneylerde olduğu gibi hücreler, 30mM DTT ile inkübe edildi. Enzim aktivitesinin ölçümü, PKC δ veya PKC ϵ 'a spesifik immunpresipite numunelerinde gerçekleştirildi ve sonuçlar, aynı immunpresipite numunelerin kullanıldığı western blot bantlarına oranlanarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre; herhangi bir muameleye maruz kalınmadığı şartlarda, bütün prostat hücrelerinde tespit edilen PKC δ enzim aktivite sonuçları kıyaslandığında, PKC δ aktivitesinin her iki prostat kanseri hücresinde kontrol hücreye oranla belirgin biçimde azaldığı gözlemlendi (Şekil 6A). Bu oran PC3'de %46, LNCaP'de ise %27 düzeyindedir. Dolayısıyla, iki kanser hücresindeki azalış birbiri ile kıyaslandığında PKC δ aktivitesi LNCaP'e nazaran PC3'de %19 oranında daha çok bozulmuştur.

Hücrelerin CDME ile muamele edilmesini takiben PKC δ aktivitesinde gelişen değişiklikler değerlendirildiğinde enzim aktivitesi, nontümörijenik prostat hücresinde değişmemesine (Şekil 4.6B) karşılık androjen-bağımlı kanser hücresinde 0.5mM CDME muamelesinde %91 ve 5mM CDME'de ise %27 oranında arttı (Şekil 4.6C). LNCaP'de bu derece yüksek oranda bir artış gözlenmesine karşılık, PC3'deki bu değerler sırasıyla %20 ve %10 olarak bulundu (Şekil 4.6D). Dolayısıyla CDME'nin PKC δ aktivitesine olan düzeltici etkisi LNCaP hücrelerinde çok daha belirgin düzeydedir. Buna ilaveten DTT muamelesi sonucunda CDME'nin tersinir etkileri, hem nontümörijenik hem de her iki tümörijenik prostat hücresinde kanıtladı.

CDME muamelesini takiben proapoptotik olan PKC δ 'nin aktivitesinde bir artış gözlenmesine karşın, prostat kanserinde aşırı derecede eksprese olan PKC- ϵ 'nin aktivitesinde ise tam ters olarak bir azalma gözlemlendi. LNCaP'de, CDME'nin 0.5mM'lık dozu %22, 5mM'lık dozu ise %90 oranında bir azalışa neden olurken (Şekil 4.6E), PC3'de ise bu değerler sırasıyla %5 ve %40 olarak saptandı (Şekil 4.6F). Bu bulgular sonucunda, her iki hücrede de PKC ϵ aktivitesinin azalmasında 5mM CDME'nin etkili olduğu anlaşıldı. Ayrıca iki farklı prostat kanseri hücresi birbirleri ile kıyaslandığında, androjen-bağımlı kanser hücresinin CDME'ye olan yanıtı daha dikkat çekicidir. Dolayısıyla; CDME, prostat kanserinde ekspresyonu aşırı derecede artan PKC ϵ aktivitesini inhibe ederek enzimin kontrolünde etkin olduğu ve bu etkinliğin de 5mM

dozda ve LNCaP hücrelerinde daha çok belirgin olduğu saptandı. CDME-indüklü PKCε aktivitesinin inhibisyonu, prostat kanseri hücrelerinin tersine nontümörijenik hücrede gözlenmedi.



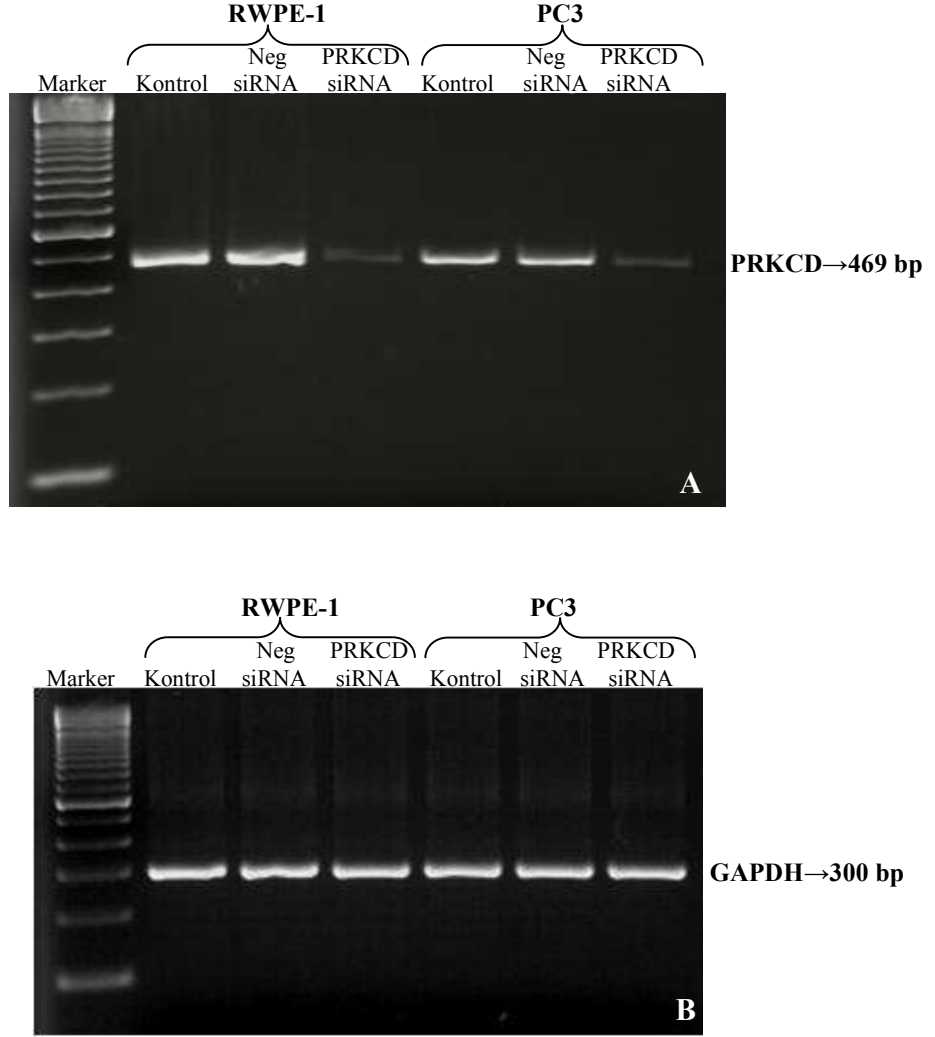


Şekil 4.6. RWPE-1, PC3 ve LNCaP hücrelerinde, CDME'nin PKC δ ve PKC ϵ aktivitesi üzerine etkisi. Herhangi bir muameleye maruz kalınmadığı şartlarda RWPE-1, PC3 ve LNCaP hücrelerindeki PKC δ aktivitesinin karşılaştırılması (A); RWPE-1 (B), LNCaP (C) ve PC3 (D) hücrelerindeki PKC δ aktivite oranları; LNCaP (E) ve PC3 (F) hücrelerindeki PKC- ϵ aktivite oranları. Sonuçlar, western blot ile elde edilen PKC δ protein bantları ve bunların Image J (NIH, Maryland, USA) dansitometre programı ile taranması sonucunda grafiksel olarak ifade edilmiştir. %kontrol olarak verilen sonuçlar; Image J (NIH, Maryland, USA) dansitometre programı ile taranan PKC δ / PKC ϵ aktivite bantlarının, immunpresipite numunelerin kullanıldığı western blot ile elde edilen PKC δ / PKC ϵ protein bantlarına oranlanmasıyla elde edilmiş olup birbirinden bağımsız üç deneyin ortalama \pm standart hata değerine karşılık gelir.

4.7. PKC δ siRNA ile PKC δ geninin (PRKCD) İnhibisyonu ve Hücre Ölümü Oranları

RNA inhibisyonu, küçük ve çift zincirli RNA moleküllerinin ilgili hücreye girmesiyle RISC (RNA-indüklü susturucu kompleks) aktivasyonuna ve bunun sonucunda da komplementer RNA'nın parçalanmasına neden olan bir mekanizmadır. Dolayısıyla, sekans spesifik siRNA'nın, komplementer mRNA'sına bağlanmasıyla ilgili genin proteine translasyonu susturulur, yani protein sentezi gen düzeyinde baskılanır. Bu bilgi ışığında, PKC δ 'nin gen düzeyinde inhibe edilmesi amacıyla hem nontümörjenik prostat hücresi olan RWPE-1 hem de tümörjenik olan PC3, PRKCD-siRNA'ları ile transfekte edildiler. Hücrelerde gerçekleşen PRKCD inhibisyonunun gösterilmesi amacıyla yapılan RT-PCR sonucunda, gerçekten hem RWPE-1'de hem de PC3'de (Şekil 4.7A) PRKCD-siRNA'nın, %90 oranında PRKCD mRNA'sını degrade ettiği saptandı. Buna karşılık Negatif-siRNA ile hücrelerin transfekte edilmesi sonucunda PRKCD'de

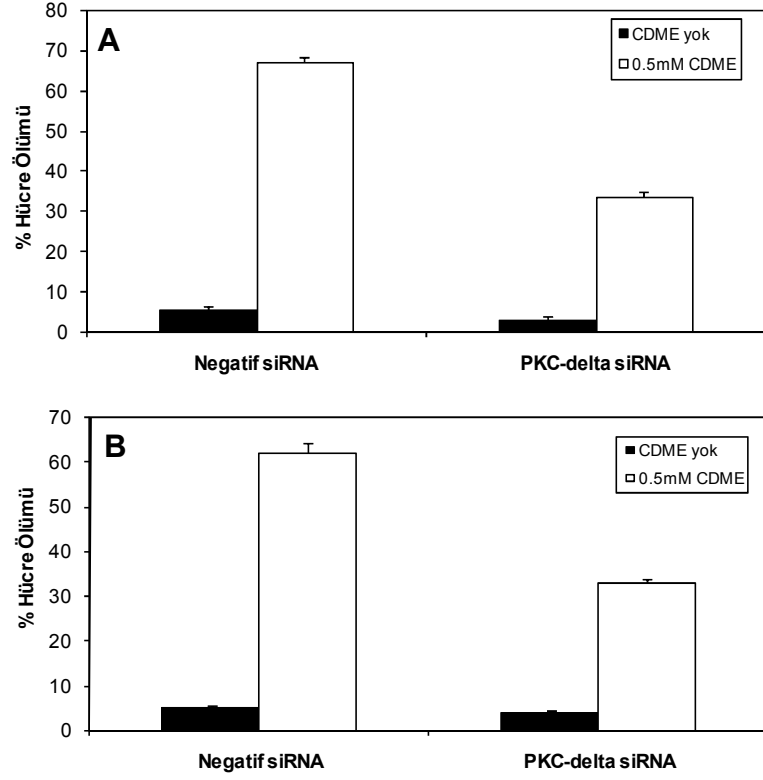
herhangi bir inhibisyon gözlenmedi. Bu da gözlenen inhibisyonun spesifik olarak PRKCD-siRNA'dan kaynaklandığını kanıtladı. Ayrıca, kontrol bir gen olan gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) için spesifik primerlerin kullanıldığı RT-PCR analizi ile, tüm numunelerin eşit miktarda RNA içerdikleri kanıtlandı (Şekil 4.7B).



Şekil 4.7. RWPE-1 ve PC3 hücrelerinde PRKCD-siRNA aracılığıyla gerçekleşen PRKCD-mRNA'nın inhibisyonu. RT-PCR analizi ile elde edilen PRKCD (A) ve GAPDH (B) gen ekspresyon bantları.

CDME-indüklü hücre ölümünün PKC δ 'a bağımlı olup olmadığını kanıtlamak amacıyla yapılan tripan-mavi deneyinde, PRKCD-siRNA aracılığıyla PKC δ enzim ekspresyonunun gen düzeyinde inhibe olduğu şartlarda RWPE-1 ve PC3 hücrelerinin canlılığı ölçüldü. Elde edilen bulgulara göre; siRNA aracılığıyla gerçekleşen PRKCD'nin inhibisyonu, kontrol hücreye (Şekil 4.8A) kıyasla PC3'de (Şekil 4.8B)

CDME-indüklü hücre ölümünde %13 oranında bir azalmaya neden oldu. Bu da, CDME-indüklü hücre ölümünün androjen-bağımsız prostat kanseri hücrelerinde PKC δ 'a bağımlı olduğunu kanıtladı.



Şekil 4.8. PRKCD-siRNA aracılığıyla gerçekleşen PRKCD-mRNA inhibisyonunun, CDME-indüklü RWPE-1 (A) ve PC3 (B) hücrelerinin ölümü üzerindeki etkisi. %hücre ölümü olarak verilen sonuçlar, birbirinden bağımsız üç deneyin ortalama \pm standart hata değerine karşılık gelir.

TARTIŞMA

Günümüzde halen erkeklerde en sık tanı konulması ve ikinci ölümcül kanser tipi olması nedeniyle prostat kanseri, araştırmacıların üzerinde sıklıkla çalıştığı bir patogenezdır. Hemen hemen birçok kanserde olduğu gibi prostat kanseri de, normal epitelyum ya da stroma hücrelerinin kanser hücrelerine transforme olmasıyla başlar. Bu transformasyondan; retinoblastoma, p53 gibi tümör supressor genlerin mutasyona uğraması sonucu inaktive olması, DNA tamirinden sorumlu mekanizmaların değişime uğraması ve STAT3, NFkB gibi transkripsiyon faktörlerin aşırı derecede eksprese olması sorumlu tutulmaktadır. Transforme olan bu hücrelerin çoğalması da kanser gelişiminin ikinci aşamasıdır. Progresyon aşamasında ise, Ras, Raf, Her2/neu gibi proto-onkogenlerin mutasyona uğraması sonucunda onkogene dönüşmesi dolayısıyla aktive olması, hücre siklusunun kontrol mediyatörlerinden CDK'ların, büyüme faktörlerinin ve anti-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu, pro-apoptotik proteinlerin inaktivasyonu öne çıkmaktadır. Son aşama olarak kabul edilen invazyon/metastaz ise, proliferen olmuş tümör hücrelerinin dolaşım vasıtasıyla diğer dokulara yayılmasını ifade etmektedir. Bu aşamada, anaerobik solunum yapan kanser hücrelerinde oksijensizlik ile uyarılan önemli bir anjiyojenik faktör olan HIF-1 α 'nın aktive olması ve bunun sonucunda da yine anjiyojenik faktörler olan VEGF ve COX-2 indüklenmesi söz konusudur. Prostat kanseri hücreleri en çok kemik dokusunda ve lenflere metastaz yapmaktadır. Prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesi ana çerçeve olarak bu şekilde özetlenebilir. Ancak tabii ki bu mekanizmalar çok daha detaylı ve kompleks bir şekilde gerçekleşmektedir. Bu nedenle prostat kanserinin moleküler mekanizmaları ne kadar çok detaylandırılabilirse, denenebilecek tedavi çeşitliliği de o derece fazla olacaktır. Prostat kanseri üzerinde çalışan birçok araştırmacının olduğu gibi bu çalışmada da amaçlanan, yeni olası terapötik ajanların bulunmasıdır. Bu düşünce ışığında CDME'nin farklı tipteki prostat kanseri üzerindeki iyileştirici etkileri araştırıldı.

Amaç kısmında da belirtildiği gibi projemizde, bir sistin kaynağı olan CDME'nin, karsinogeneziste önemli rolleri olan PK δ ve PKC ϵ izozimlerinin prostat kanserinde bozulan fonksiyonlarını düzeltip düzeltmediği ve bunun sonucunda da prostat kanseri hücrelerinin canlılığının değişip değişmediği incelendi. Ayrıca bu değişimler nontümöröjenik prostat epitelyum hücrelerine kıyaslanarak değerlendirildi. Bu oldukça önemli, çünkü genel olarak kanser tedavilerindeki asıl sorun kanser hücrelerini öldürmek amacıyla verilen ajanların aynı zamanda normal hücreyi de öldürmesi, yani seçiciliğin olmaması. Bu nedenle CDME'nin etkileri eş zamanlı olarak kontrol hücrede de gözlenerek kanser hücrelerine olan hassasiyet daha sağlıklı değerlendirildi.

PKC δ 'nın kanser hücreleri üzerindeki baskılayıcı etkileri ile ilişkili olarak Nakagawa ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, PKC δ 'nin p21'i ve retinoblastomayı

upregüle ederek hücre siklusunu durdurduğu akciğer kanseri hücrelerinde kanıtlanmıştır [128]. Prostat kanseri ile ilişkili olarak Zhao ve arkadaşları, androjen-bağımlı prostat kanseri hücresi LNCaP'nin ölümünün p21 aktivasyonu ve retinoblastomanın hiperfosforilasyonu takibinde gerçekleştiğini bildirmişlerdir [129]. Fuji ve arkadaşları da bunu destekleyerek, PKC δ 'nın katalitik biriminin ATP bağlayıcı bölgesine spesifik inhibisyonun LNCaP hücrelerini apoptozdan koruduğunu göstermiştir [86]. Tanaka ve arkadaşları ise, Fujii ve arkadaşlarının bulgularını bir adım daha ileriye götürerek prostat kanserinde PKC δ 'nın apoptozisi indükleyici etkilerinin p38MAPK yolu üzerinden gerçekleştiğini rapor etmişlerdir [130]. Buna paralel olarak Yin ve arkadaşları da, LNCaP'den türetilen ve androjene LNCaP'den çok daha fazla duyarlı prostat kanseri hücreleri olan C4-2'nin ölümünün mutlak bir şekilde PKC δ üzerinden p38 fosforilasyonu aracılığıyla gerçekleştiği bulgusunu desteklemiştir [131]. PKC α ve PKC ϵ 'nin aksine sadece PKC δ 'nın bu yönde bir etkiye sahip olduğu, PKC δ 'a spesifik siRNA ile PKC δ geninin inhibe edilmesiyle kanıtlanmıştır. PKC δ varlığında C4-2 hücreleri PMA ile indüklendiğinde apoptoza giderken, PKC δ geni inhibe olduğu şartlarda PMA ile indüklendiğinde dahi hücrelerde p38 aktivasyonu gözlenmemiştir. Buna ilaveten hücre siklusunu baskılayan çok önemli bir tümör supressör geni olan retinoblastomanın da PMA-indüklü hiperfosforilasyonunun, PKC δ siRNA'sı varlığında baskılandığı saptanmıştır. Aynı araştırmacılar, PKC δ siRNA'sı varlığında apoptozisin önemli markerları olan DNA fragmentasyonunun ve PARP parçalanmasının gerçekleşmediğini gözlemişlerdir. Gonzalez-Guerrico ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise LNCaP hücrelerinde PKC δ 'nın, bir ölüm reseptör efektörü olarak fonksiyon göstererek ekstrinsik apoptotik yolu indüklediği belirtilmiştir [132]. Bu etkisini TNFR1 üzerinden gösteren PKC δ , TNF- α 'ya yanıt olarak TNFR1 ve PI3K ile bir sinyal kompleksi oluşturur. Bununla ilişkili olarak Chang ve arkadaşları da intestinal hücrelerde TNF- α 'nın, PKC δ 'nin membrana olan translokasyonunu ve sonuçta da apoptozisi uyardığını bildirmiştir [133]. Yukarıda bahsedilen ve bulgularıyla birbirlerini destekleyen tüm bu çalışmalar, prostat kanseri hücrelerinin apoptoza gidebilmeleri için PKC δ 'a bağımlı olduğunu, tersine PKC δ olmadığında apoptozun gerçekleşmediğini açıkça ifade etmektedir.

PKC δ 'nin prostat kanseri hücrelerinin apoptozisindeki kilit fonksiyonunu gösteren bulgular ışığında, çalışmamızda CDME muamelesi olmaksızın kontrol şartlardaki PKC δ protein ekspresyonu ve enzim aktivite sonuçları, hem kontrol yani nontümörjenik olan RWPE1 hücresinde hem de androjen bağımsız PC3 ve androjen-bağımlı LNCaP olmak üzere iki farklı prostat kanseri hücresinde değerlendirildi. Buna göre, PKC δ protein ekspresyonu kontrol hücreye kıyasla hem PC3 hem de LNCaP hücresinde sırasıyla %16 ve %13 oranında azalmıştır. PKC δ 'a ait protein bantlarının dansitometrede taranması sonucunda elde edilen bu değerler, PKC δ enzim aktivite değerleri ile de paralellik göstermektedir. Enzim aktivitesi kontrol hücreye kıyasla PC3'de %46, LNCaP'de ise %27 oranında azalmıştır. Ayrıca iki farklı tipteki prostat kanseri hücresi de birbiri ile kıyaslandığında, progresyonu daha agresif olan PC3 hücresi, hem protein ekspresyonu hem de enzim aktivitesi yönünden LNCaP'e kıyasla daha düşük PKC δ değerlerine sahiptir. Dolayısıyla apoptozisi indükleyen ve hücre proliferasyonunu inhibe eden önemli bir sinyal proteini olan PKC δ , prostat kanseri

hücrelerinde özellikle de androjen-bağımsız tipte olanlarda belirgin bir biçimde azalmıştır. Bilgilerimiz dahilinde prostat kanserinde PKC δ 'nın ekspresyonunun incelendiği tek çalışma Cornford ve arkadaşları tarafından yapılmıştır [134]. Araştırmacılar, 10 BPH ve 23 prostat kanserli hastadan aldıkları doku örneklerinde immunohistokimya yöntemiyle değerlendirdikleri PKC δ protein ekspresyonlarını kontrol prostat dokusu ile kıyaslamışlar ve sonuçta PKC δ 'nın ne BPH ne de kanser hücrelerinin epitelinde eksprese olmadığını saptamışlar. Buna karşılık kanser hücrelerinin stromasında ise, kontrole kıyasla kuvvetli ekspresyon gözlemlemişler. Bizim elde ettiğimiz bulgular epitelyum kaynaklı hücreler olduğu için stromadaki verilerle kıyaslayamıyoruz. Ancak bizden farklı olarak epitelyumda PKC δ ekspresyonunun gözlenmemesinin nedeni ise, analiz edilen dokuların prostat kanserinin erken evresindeki hastalara ait olmasından kaynaklanmış olabilir. Oysa ki bizim çalışmamızda PKC δ ekspresyonunu incelediğimiz hücreler ise ileri evre yani metastaz yapmış prostat kanseri hücreleridir (PC3 kemik dokusu metastazına, LNCaP ise lenf nodu metastazına sahiptir). Diğer kanser tiplerindeki PKC δ değişiklikleri değerlendirilecek olursa; Varga ve arkadaşları, 23 mesane kanseri hastasından aldıkları mesane dokusu örneklerini histolojik özelliklerine göre derecelendirmişler ve 5 farklı PKC izoziminin (α , β , δ , ϵ , ζ) protein ekspresyonlarındaki değişiklikleri western blot analizi ile değerlendirmişler [135]. Buna göre, kontrol mesane dokusunda tespit edilen değerlerle kıyaslandığında PKC δ ve PKC β protein ekspresyonları, kanserli dokularda anlamlı olarak azalmıştır, hatta bu azalış artan tümör derecesiyle birlikte daha da belirginleşmiştir. Mandil ve arkadaşları da PKC δ 'nın ekspresyonunu beyin tümörlerinde incelemişlerdir [136]. Buna göre, 25 hastadan aldıkları glia tümör dokularını patolojik olarak derecelendirdikten sonra yüksek dereceye sahip glialardaki hem PKC δ protein ekspresyonunun hem de enzim aktivite düzeylerinin düşük derecedekilere kıyasla tespit edilmez düzeyde azaldığını saptamışlardır. Son olarak D'Costa ve arkadaşları da, PKC δ 'nın azalan ekspresyonunu skuamöz hücreli karsinomlarda (SCC) tespit etmişlerdir [137]. 42 SCC hastasına ait dokularda immunohistokimya ve western blot analizleriyle tespit edilen PKC δ protein ekspresyonu, normal epidermis dokusundaki düzeylerle kıyaslandığında çok belirgin bir biçimde azaldığı hatta tamamen olmadığı gözlenmiştir. Buna ek olarak aynı araştırmacılar tarafından, insan nontümörjenik keratinosit hücre dizisi olan HaCaT'nin Ras onkogeni ile transfekte edildiğinde PKC δ 'nın inaktive olduğu, HaCaT-Ras hücrelerinin PKC δ kodlu retrovirus ile transfekte edildiğinde ise PKC δ 'nın tekrar aktive olduğu, hatta HaCaT-Ras hücrelerinin tümörjenitesinin baskılandığı saptanmıştır. Bu bulgu da araştırmacıların, SCC hücrelerinde PKC δ 'nın bir tümör supressor geni için aday olabileceğini düşünmesine yol açmıştır. Kanserde PKC δ azalışının saptandığı tüm bu örneklerden farklı olarak kolon kanserinde durum biraz farklıdır. Çünkü bu tip kanserde PKC δ ekspresyonunun hem arttığı hem de azaldığı yönünde bulgular mevcuttur. Perletti ve arkadaşları, nontümörjenik kolon epitelyum hücreleri ile Src onkogeni aracılığıyla transforme edilmiş kolon epitelyum hücrelerindeki PKC δ , PK ϵ ve PKC ζ protein ekspresyonlarını karşılaştırdıklarında, PK ϵ ve PKC ζ protein değerlerinde herhangi bir değişme gözlemezken, PKC δ 'ninkinde anlamlı derecede bir azalma gözlemişlerdir [138]. Araştırmacılar PKC δ 'nın, epitelyum kökenli kolon kanserinin transformasyonunda önemli bir rol oynadığına dikkat çekmişlerdir. Buna karşılık Pongracz ve arkadaşları

tarafından 13 kolon kanserli hastadan alınan doku örneklerinde yapılan analizlerde ise, PKC δ protein ekspresyonunun normal mukoza dokusuna kıyasla kolon kanserinde belirgin biçimde arttığı saptanmıştır [139]. Kolon kanserinde PKC δ 'nın ekspresyonu üzerindeki çelişkili verilerden dolayı, daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Prostat kanserinin de dahil olduğu birçok farklı kanser hücrelerinde yapılan tüm bu çalışmalar, kanserde PKC δ 'nın ekspresyonunun azaldığını açıkça göstermiştir. Bunun nedeni olarak, kanser hücresi içerisinde oksidasyon-redüksiyon şartlarının değişmesi ve bunun sonucunda da proteinin yapısını ve daha sonra fonksiyonunu kaybetmesi sorumlu tutulmaktadır. PKC δ , oldukça reaktif tiyol fonksiyonel grubuna sahip olan sistein amino asitince zengin olduğu için bu değişimden öncelikli olarak etkilenen bir proteindir. PKC δ 'nın regülatör kısmında bulunan 6 sistein biriminin 5'i Zn⁺² ile direkt olarak ilişki içerisindedir. Dolayısıyla katalitik öneme sahip olan ve Zn⁺² atomunu molekül içerisinde tutan bu sistein birimlerinin kanser hücrelerinde oksidatif modifikasyona uğraması sonucunda, Zn⁺² atomu protein yapısından ayrılarak proteinin fonksiyonunun kaybına neden olur [7].

PKC δ 'nın pro-apoptotik etkilerinden dolayı karsinogenez üzerindeki baskılayıcı etkilerine karşılık, aynı PKC grubunda yer almasına rağmen tamamen zıt etkilere sahip olan PKC ϵ onkojenik bir protein olarak tümörü indükleyen etkilere sahiptir. Çalışmadan elde ettiğimiz bulgular, hem PKC ϵ protein ekspresyonunun hem de enzim aktivitesinin normal prostat hücresine kıyasla kanser hücrelerinde arttığını göstermiştir. Bu artış PC3'de %40 iken LNCaP'de ise %20 oranında olmuştur. Buna ilaveten androjen-bağımlı ve -bağımsız olan iki farklı prostat kanseri hücresini birbirleriyle kıyasladığımızda, PKC ϵ 'daki artışın androjen-bağımsız olan PC3'de 2 kat daha fazla olduğunu saptadık. Dolayısıyla, prostat kanseri hücrelerinde onkojenik PKC ϵ 'nın arttığını, tam tersi etkileri olan pro-apoptotik PKC δ 'nın ise azaldığını kanıtladık. PKC δ 'daki azalışa paralellik göstererek, PKC ϵ da en çok agresif tip prostat kanser hücreleri olarak tanımlanan PC3 hücrelerinde artmıştır. Bu yöndeki bulgularımız, Wu ve arkadaşlarının bulguları ile paralellik göstermektedir. Araştırmacılar, LNCaP'e kıyasla PC3 hücresinde saptadıkları bu artışın hem PKC ϵ 'na ait protein düzeyinde hem de gen düzeyinde gerçekleştiğini, ayrıca PKC ϵ artışına Raf-1 ve fosfo-ERK1/2 artışlarının da eşlik ettiğini göstermişlerdir [117]. PC3'nin LNCaP'e nazaran daha agresif olmasının nedenleri arasında, PC3'nin androjen reseptörüne sahip olmaması nedeniyle iki hücrenin androjen hassasiyetindeki farklılıkları dışında en çok PC3'nin anjiyojenik özelliklerinin ağır basmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü anjiyojenik faktörlerden VEGF-C, TGF β 1 ve TGF β 2 sadece PC3 hücrelerinde eksprese edilirken, IL-8, MMP-9 ve TGF α ise LNCaP'e oranla PC3'de çok daha fazla miktarda eksprese edilir [140]. Ayrıca, AR ile TGF β arasında ters bir ilişki tanımlanmıştır [141]. Yani AR, TGF β indüklü apoptozisi baskılar. Bu da AR içermeyen ve çok hızlı proliferasyon yapan ve PC3 hücrelerinin apoptozisinin neden baskılandığına başka bir açıklama getirmektedir.

Prostat kanseri hücrelerinde gözlemediğimiz PKC ϵ ekspresyonundaki artış, diğer araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir. Aynı çalışmadan PKC δ kısmında da bahsedildiği gibi Cornford ve arkadaşları, PKC ϵ ekspresyonlarını erken evre prostat kanseri dokularında incelemişlerdir [134]. Buna göre, hem kontrol dokuya

hem de BPH'li dokuya kıyasla sadece kanser dokularında (vakaların %96'sında) PKCε'nun arttığını saptamışlardır. Bu artış hiçbir vakada stromada ortaya çıkmazken, hepsi epitelyumda gerçekleşmiştir. Ancak, PKCε'daki bu artış ile tümörün gleason skor derecelendirilmesi arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır. Koren ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, 28 BPH'li ve 25 prostat kanserli hastadan alınan doku örneklerinde yapılan immunohistokimya ve western blot analizleri sonucunda, kontrol ve BPH'li vakaların tamamında negatif PKCε boyaması gözlenmesine karşılık 25 kanser dokusunun tamamında pozitif boyama saptanmıştır. Bu nedenle PKCε, BPH ve kanser arasındaki ayırımı yapılırsa kullanılabilir en güçlü markerlardan birisi olarak öne çıkmaktadır. Cornford ve arkadaşlarına paralel olarak bu araştırmacılar da, PKCε ekspresyon artışının gleason skor ile ilişkisiz olduğunu belirtmişlerdir. Prostat kanserinde PKCε ekspresyonundaki artışın nedeni, Wu ve arkadaşlarının LNCaP hücrelerinde gösterdiği üzere PKCε ekspresyonundaki artış, hücre siklusunun G1/S kontrol noktasının hızla geçilmesine neden olmaktadır [117]. Hücre siklusunun en önemli kontrol basamağı olarak tanımlanan bu aşamanın transit geçilmesiyle, hücre durmaksızın çoğalır. Aynı araştırmacılar ayrıca, PKCε'nun ERK aktivasyonuna ve bunun takibinde de hücre siklusu üzerinde baskılayıcı etkilere sahip olan tümör supressor geni retinoblastomanın hiperfosforilasyonuna yani deaktivasyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir. PKCε'nun hücre proliferasyonu üzerindeki indükleyici etkilerine karşılık yine bir prostat kanser hücresi olan CWR-R2'de yapılan başka bir çalışmaya göre PKCε, mitokondriye bağımlı apoptotik yolağın önemli mediyatörlerinden olan Bax'ın oligomerizasyonunu bloke ederek Bax'ın mitokondriye transloke olmasını ve takibinde de mitokondriden sitokrom C salınımını engelleyerek intrinsik apoptotik yolağı bloke etmektedir [76]. Bahsedilen tüm bu çalışmalar, prostat kanserinde PKCε aktivitesindeki artışın hem kanser hücrelerinin proliferasyonunun indüklenmesine hem de hücre apoptozisinin baskılanmasına yol açtığını açıkça ifade etmektedir. Prostat kanserinde PKCε aktivasyonunda gözlenen bu değişikliğin sebebinin ise, PKCδ'da olduğu gibi PKCε'da da kanserde değişen oksidatif şartlardan kaynaklandığı yönündedir [7]. PKCδ gibi PKCε da sisteince zengin bir proteindir ve dolayısıyla hücre içerisinde artan oksidatif stresten öncelikle etkilenerek yapısında bulunan tiyol grupları okside olur. Ancak burada çelişkili olan bir durum vardır. Prostat kanseri hücresinde ortaya çıkan oksidatif değişiklikler nasıl oluyor da aynı PKC alt ailesinin (yeni grup) üyesi olmasına karşılık PKCε'nun aktivasyonuna PKCδ'nın ise inaktivasyonuna neden oluyor. Bunun açıklaması çok net olmamakla birlikte bu iki farklı PKC üyesinin yapısında bulunan C1 biriminin konformasyonel esnekliğindeki ve DAG'e olan afinitelerindeki farklılıklardan ileri gelebileceğini düşünmekteyiz. PKCε'nun hem C1A hem de C1B birimleri DAG'e karşı yüksek affiniteye sahipken, PKCδ'nın ise sadece C1A birimi bu özeliğe sahiptir. Ayrıca PKCε'nun DAG'e olan afinitesi daha fazla olduğu için DAG-indüklü membran traslokasyonu da PKCδ'ya nazaran çok daha hızlıdır. C2 biriminin asidik fosfolipidler için tanıma bölgesi olmasına karşılık her iki izozimin membrana traslokasyonunda C2 birimi değil C1 birimi etkili olduğu ifade edilmiştir [142]. Bu nedenle, C1A ve C1B birimleri arasında hem aminoasit diziliminden dolayı hem de buna bağlı olarak fonksiyon farklılıklarından dolayı PKCε ve PKCδ enzimleri prostat kanserinde farklı yönde davranış gösterirler.

Prostat kanserine ek olarak diğer kanser tiplerinde de PKCε'nun arttığı kanıtlanmıştır. Varga ve arkadaşları, mesane kanseri hastalarından aldıkları doku örneklerinde western blot ile elde edilen PKCε protein ekspresyonlarının kontrol dokuya kıyasla belirgin olarak arttığını, hatta bu artışın prostat kanserinin aksine mesane kanserinin derecelendirilmesi ile pozitif yönde ilişkili olduğunu saptamışlardır [135]. Sharif ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayla da PKCε ekspresyonunun bu seferde beyin tümör hücre dizilerinde aşırı derecede arttığı gösterilmiştir [143]. Ancak bu artış, tümörün 2., 3. ve 4. derecesinde gerçekleşmesine karşılık 1. derecesinde gözlenmemiştir. Meme kanserinde yapılan çalışma ise Pan ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [144]. Araştırmacıları, hem meme kanseri hücre dizilerinde (MDA-MB231), hem bu hücre dizilerinin meme dokusuna transfekte edilmesiyle elde edilen meme kanserli ratlarda, hem de 144 invaziv duktal meme karsinomlu hastadan (invaziv duktal meme kanseri, tüm meme kanseri olgularının %80'nini oluşturur) alınan primer tümör doku örneklerinde yaptıkları çalışmada, mikroarray yöntemi ile PKCε proteinin hastaların %73.6'sında bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmanın bulgularına göre hasta tümör dokularında immunohistokimya analizleri ile saptadıkları PKCε ekspresyonundaki artış, histolojik derecelendirmenin artışı ile, Her2/neu reseptörü pozitif boyaması ile ve negatif östrojen ve progesteron reseptörü ile anlamlı olarak ilişkilidir. MDA-MB231 hücrelerinin PKCε'ya spesifik siRNA ile transfekte edilmesini takiben ise PKCε protein düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı, dolayısıyla daha az proliferere ve daha az invaziv oldukları gözlenmiştir. Bu nedenlerden dolayı araştırmacılar PKCε'nun, agresif tip meme kanserinin bir biyomarker olduğu sonucuna varmışlardır. Kanserde PKCε'nun aşırı derecede eksprese olduğuna dair çok sayıda örnekler olmasına rağmen, kolon ve tiroid kanserinde tam tersi olarak PKCε düzeylerinin azaldığı bulunmuştur. PKCε ve PKCδ'nın karsinogenezis üzerindeki birbirine zıt etkileri olduğu düşünüldüğünde, daha önce bahsedildiği gibi kolon kanserinde PKCδ ekspresyonunun artmasına karşılık PKCε'nun azalması hiç şaşırtıcı değildir. Pongracz ve arkadaşları 13 kolon kanserli hastadan aldıkları doku örneklerindeki western blot analizi ile tespit ettikleri PKCε protein ekspresyonlarının, normal mukozaya kıyasla anlamlı derecede azaldığını bulmuşlardır [139]. Tiroid kanserinde PKCε ile ilişkili olarak elde edilen veriler de kolon kanserindekiler ile paralellik göstermektedir. Knauf ve arkadaşları, PKCε ekspresyon analizlerini 9 adet tiroid kanseri tanısı koyulmuş hastanın cerrahi operasyonları sonucunda elde edilen doku örneklerinde gerçekleştirmişlerdir [145]. Sonuçta, aynı hastaya ait tiroid dokusunun hem normal kısmında hem de tümör gelişmiş kısmında yapılan western blot ve southern blot analizleri sonucunda normal hücrelere kıyasla PKCε ekspresyonu, hem gen hem de protein düzeyinde kanserli hücrelerde anlamlı derecede azalmıştır. Yukarıda belirtilen tüm bu çalışmalar sonucunda tiroid ve kolon kanseri istisnaları dışında birçok farklı kanser tipinde, onkojenik etkiye sahip olan PKCε'nun ekspresyonunun arttığı açıkça belirtilmiştir. Bizim prostat kanseri hücrelerinde saptadığımız PKCε artışları da tüm bu çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Birbirine tamamen zıt etkilere sahip olan pro-apoptotik PKCδ ve onkojenik PKCε enzimleri, normal hücrenin tümör hücresine transformasyonunda, oluşan tümörün progresyonunda ve en sonunda da invazyon/metastazında etkili ve kilit rollere sahip

olduğu daha önceden belirtilen mekanizmalar doğrultusunda açıklanmıştır. Kolon ve tiroid kanseri istisnaları dışında, prostat kanserinin de dahil olduğu birçok kanser tipinde PKC δ 'nın inaktive ve PKC ϵ 'nin ise aşırı derecede eksprese olduğu örneklerle belirtilmiştir. Bunun en büyük nedenlerinden birinin ise, kanserli hücredeki oksidasyon/redüksiyon mekanizmalarının bozulması ve takibinde proteinin yapısında meydana gelen değişikliklerden ileri geldiği belirtilmiştir [7]. Bu oksidatif modifikasyonlardan en çok etkilenen proteinlerden birisi PKC'lerdir. Çünkü, PKC'ler yapılarında 16-28 sistein rezidüsü içerirler. Bilindiği gibi sistein aminoasiti yan grubunda içerdiği tiyol (-SH) grubundan dolayı oksidatif değişikliklere çok duyarlıdır ve tiyol grubundaki hidrojenini verme eğilimindedir. Oksidatif patlamadan sadece dakikalar sonra nonenzimatik bir mekanizmayla sistein rezidülerinin okside olması sonucunda geri dönüşümlü olan S-tiyolasyon mekanizması gerçekleşir. S-tiyolasyon, GSH veya düşük molekül ağırlıklı tiyoller ile proteinin redoks sensitiv sistein birimleri arasında disülfid bağının oluşmasını içermektedir. S-tiyolasyon, aslında protein için koruyucu bir mekanizmadır. Çünkü, böylelikle proteinin geri dönüşümsüz hasara uğraması önlenmiş olunur. PKC'lerde bulunan 16-28 sistein biriminden 1-3 tanesinin bu disülfid bağının oluşumuna katılması enzimin tamamen inaktive olmasına yeterli olduğu belirtilmektedir. Bu düşünceden yola çıkarak ilk defa Ward ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmayla, büyümeyi indükleyen ve dolayısıyla karsinogenezise katkı sağlayabilecek potansiyele sahip PKC izozimlerinin oksidan indüklü S-tiyolasyon mekanizması ile inhibe edilip edilemediği araştırılmıştır [146]. Bu amaçla araştırmacılar rat beyinlerinden saflaştırdıkları total PKC enziminde ve spesifik olarak rekombinanat PKC α 'da yaptıkları analizler sonucunda, tiyol spesifik bir oksidan ajan olan diamidin (5mM) 100 μ M GSH varlığında rekombinant PKC α 'yı tamamen, pürifiye PKC izozim karışımını ise %95 oranında inaktive ettiğini göstermişlerdir. Chu ve arkadaşları da, Ward ve arkadaşları gibi diamid ile saflaştırılmış PKC izozimleri GSH varlığında inkübe edildiğinde her iki yapı arasında disülfid formasyonunun yani S-tiyolasyonunun gerçekleştiğini, bunun sonucunda da enzimlerin inaktive olduğunu gözlemlemişlerdir [147]. Yalnız araştırmacılar buna ek olarak, PKC α 'dan başka onkojenik olan ϵ 'nin de bu inaktivasyona oldukça duyarlı olduğunu; ancak, büyümeyi baskılayıcı yönde etkili olan δ 'nın ise tam ters olarak dirençli olduğunu göstermişlerdir. Öyle ki, PKC δ 'nın tamamen inaktive olabilmesi için birkaç kat daha fazla konsantrasyondaki diamid ile inkübe edilmesi gerekmektedir.

Oksidatif stresle ilişkili patogenezlere bozulan PKC fonksiyonlarının S-tiyolasyon üzerinden düzenlenmesi amacıyla diamidden başka ajanlar da denenmiştir. Bunlar arasında GSSG, sistamin ve sistin bulunmaktadır. Burada dikkat çekilmesi gereken nokta, bütün bu ajanların küçük molekül ağırlıklı tiyol antioksidanların disülfid formlarının olmasıdır. Forbol ester aracılı tümör progresyonuna antagonize etkilere sahip olan tiyol antioksidanların (GSH, sistein) aksine bunların disülfid formlarının kanserin önlenmesi için PKC izozimlerinin aktivitelerinde daha belirgin değişimleri indüklediği belirtilmiştir [8]. Bu değişim, PKC'lerin yapısındaki tiyoller ile disülfid bileşiklerin yer değiştirmesi sonucunda bir veya daha fazla sistein rezidüsünün kovalent modifikasyona uğraması olarak tanımlanmaktadır [148]. Chu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada hem tiyol gruplarının (GSH, sistein, Cys-Gly, hem de bunların disülfid

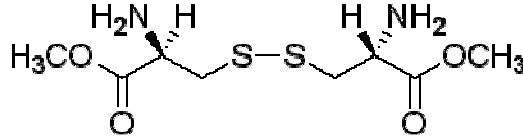
formlarının (GSSG, sistin, [Cys-Gly]₂, sistamin) pürifiye PKC δ ve PKC ϵ aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemiştir [8]. Buna göre pro-apoptotik PKC δ aktivitesinde GSH, sistein, Cys-Gly muamelesine cevaben herhangi bir değişiklik gözlenmezken, tersine bu ajanların disülfid formu bu izozimin aktivitesinde yaklaşık 2.5 kat kadar bir artışa neden olmuştur. Benzer olarak onkojenik PKC ϵ aktivitesi de tiyol grupların aksine disülfid ajanlar ile muamele sonucunda bir azalma göstermiştir. Ancak PKC δ 'daki artıştan farklı olarak bu değişiklik kısmen değil PKC ϵ aktivitesinin tamamen azalmasına neden olmuştur. Araştırmacılar farklı disülfid ajanların etkinliklerini karşılaştırdıklarında ise sistinin, hem PKC δ aktivitesinin artışında hem de PKC ϵ aktivitesinin azalışında GSSG ve [Cys-Gly]₂ kıyasla daha etkili olduğunu; ancak, bir sistin kaynağı olan sistaminin ise PKC'nin bu iki izoziminin oksidatif regülasyonu üzerinde sistinden birkaç kat daha fazla etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Sistin ve sistamin bu yöndeki etkisi, her iki izozimin de S-sisteinlenmesine (PKC-S-S-Cys) neden olmasından kaynaklanmaktadır. Bu sisteinlenmenin ise, her bir izozimin yapısında bulunan oldukça yüksek redoks duyarlılığına sahip ve anahtar rol oynayan sadece bir sistein birimi üzerinden olduğu yönünde görüşler mevcuttur. PKC ϵ 'da bu sistein birimi, enzimin aktif merkezinde bulunan Cys⁴⁵² dir. Chu ve arkadaşları mutajenik Cys⁴⁵², Cys⁴⁷⁴, Cys⁴⁷⁵, Cys⁵⁴⁶, Cys⁵⁵⁴, Cys⁵⁶⁸, Cys⁶⁵² primerleri ile ayrı ayrı transfekte ettikleri COS-7 hücrelerinde yaptıkları analizler sonucunda, hücrelerin sistamin ile indüklenmesini takiben Cys⁴⁵² dışındaki diğer tüm transfekte hücrelerde PKC ϵ aktivitesinde %90 oranında kayıp gözlenmesine karşılık, sadece mutant Cys⁴⁵² ile transfekte edilen hücrelerde PKC ϵ 'nun sistin ve sistamin indüklü inaktivasyona karşı dirençli olduğunu saptamışlardır [148]. Bu sonuç disülfidlerin, enzimin aktif merkezindeki Cys⁴⁵² birimini S-sisteinilasyona uğratarak PKC ϵ inaktivasyonuna aracılık ettiğini açıkça göstermektedir. PKC ϵ 'da anahtar öneme sahip redoks sensitiv Cys biriminin tam olarak kanıtlanmasına karşılık ne yazık ki PKC δ 'daki kilit Cys biriminin hangisi olduğu henüz tanımlanamamıştır. Ancak, PKC δ 'nın regülatör biriminde bulunması muhtemel bu Cys biriminin S-sisteinasyona uğraması proteinde konformasyonel bir değişikliğe neden olarak regülatör biriminin Zn⁺² parmak yapısında bulunan Zn⁺² nun yapıdan salındığı rapor edilmiştir [8]. Bu da, PKC δ 'nın aktivasyonuna neden olmaktadır. Böylelikle disülfid uyarımı sonucunda pro-apoptotik PKC δ 'nın aktivasyonu ve onkojenik PKC ϵ 'nun inhibisyonu sağlanarak kanser hücrelerinin progresyonunun önlenmesinde çok önemli bir adım atılmış olur.

Daha önce farklı araştırmacılar tarafından PKC aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılan tiyol antioksidan maddelerin disülfid formları olan diamid, GSSG, sistin ve sistamin gibi ajanların bulgularını baz alarak çalışmamızda, bir sistin prekürsörü olan CDME'nin PKC δ ve PKC ϵ üzerinden prostat kanseri hücrelerindeki etkileri araştırılmıştır. Bulgularımıza göre CDME, prostat kanserinde ekspresyonu azalan pro-apoptotik PKC δ 'nın aktivasyonuna, ekspresyonu artan onkojenik PKC ϵ 'nunkinin ise inaktivasyonuna neden olmuştur. CDME'nin iki farklı PKC izozimi üzerindeki bifazik etkisinin ise doza bağımlı olduğu gözlenmiştir. CDME, PKC δ üzerindeki düzenleyici etkisini 0.5mM dozunda gösterirken, PKC ϵ 'da ise 5 mM'da göstermiştir. Ayrıca önemli bir noktaya dikkat çekmek gerekirse, CDME'nin bu iki PKC izozimi üzerindeki düzenleyici etkisi nontümörjenik prostat hücresi olan RWPE-1'a kıyasla androjen-

bağımlı LNCaP ve androjen-bağımsız PC3 olmak üzere iki farklı prostat kanser hücresinde belirgindir. 0.5mM CDME, kontrol prostat hücresinde PKC δ ekspresyonu üzerinde %30 ve aktivasyonu üzerinde %10 oranında bir azalışa neden olurken, prostat kanser hücreleri olan PC3'de her iki parametre için %20'lik, LNCaP'de sırasıyla %25 ve %90'lık artışlara neden olur. Apoptotik bir protein olan PKC δ 'nın kontrol hücrede CDME'nin etkisiyle azalması, oldukça şaşırtıcı ve kanserin progresyonu açısından etkili bir sonuçtur. Prostat kanserin tedavisi için çok önemli olan bu sonuç CDME'nin, aynı ortamda bulunan sağlıklı hücreleri apoptozdan koruduğunu tersine kanser hücrelerini de apoptoza götürdüğünü gösterir. Bunun nedeni olarak, oksidatif modifikasyona uğramamış olan kontrol hücresi normal bir şekilde DAG ile aktive olabilen PKC δ aktivitesine sahipken ortamda bulunan CDME'nin, enzimin DAG bağlayıcı bölgesi olan C1'deki hidrofobik birimler ile etkileşime girerek, DAG'ın bağlanmasını kısmen engellediğini ve sonuçta bunun da enzimdeki fonksiyon kaybı ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Diğer taraftan 5mM CDME indüksiyonu sonucunda, kontrol prostat hücresinde PKC ϵ protein ekspresyonu değişmezken enzim aktivitesi tespit edilememiştir. Prostat kanser hücrelerine bakıldığında ise 5mM CDME, PC3'de sırasıyla %33 ve %40, LNCaP'de sırasıyla %68 ve %90 oranlarında bir azalışa neden olur. CDME etkilerini baskılamak amacıyla disülfid bağ kırıcı bir ajan olan DTT ile hücreleri muamale ettiğimizde DTT'nin, CDME'nin etkilerini tersinir olarak inhibe ettiğini, DTT varlığında her iki PKC izoziminin CDME aracılığıyla regüle olmadığı gözlemledik. Sonuçlardan anlaşılacağı gibi, CDME doza bağlı olarak PKC δ aktivasyonunda ve PKC ϵ inaktivasyonunda kanser hücrelerinde etkinlik gösterir. Ayrıca iki farklı tipteki prostat kanser hücresini kıyasladığımızda, CDME indüklü PKC δ aktivasyonuna ve PKC ϵ inaktivasyonuna androjen-bağımsız olan PC3'nin daha dirençli olduğunu, iki PKC izozimini kıyasladığımızda ise PKC ϵ 'nin PKC δ 'a göre CDME tarafından regülasyona karşı daha hassas olduğunu saptadık. Oysa ki, yaptığımız CBP ölçümleri sonucunda, hücreye CDME verilmesini takiben hücre içi sistin miktarının kanser hücrelerinde olduğu gibi kontrol hücrede de arttığını gözlemiştik. Ancak yaptığımız ileri analizler, kontrol hücrede artan sistin miktarının PKC izozimlerini regüle etmediğini gösterdi. Bunun nedeni, kontrol hücrede PKC izozimlerinin S-tiyolasyona uğramamasından dolayı tiyol-disülfid değişiminin gerçekleşmemesi olarak açıklanabilir.

Bilgilerimiz dahilinde yapılan literatür taramasına göre CDME'nin, PKC δ ve PKC ϵ aktivitesi üzerindeki etkilerinin incelendiği yalnızca bir çalışma bulunmaktadır [121]. Chu ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada analizler, transforme olmuş maymun böbrek hücreleri olan COS7'nin PKC ϵ ve PKC δ geni taşıyan plazmidler ile ayrı ayrı transfekte edilmesiyle elde edilen hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar, COS7-PKC ϵ hücrelerini 37 °C'de 30 dakika süresince 1, 5, 10 ve 15mM olmak üzere 4 farklı konsantrasyondaki CDME ve sistamin ile ayrı ayrı muamele etmişler ve sonuçta PKC ϵ aktivitesinde doz artışına bağlı olarak herhangi bir muamelenin olmadığı duruma kıyasla %80'e kadar bir azalma saptamışlardır. Ancak asıl belirgin azalma CDME'nin 10mM dozunda gerçekleşmiştir. Buna ilaveten PKC ϵ inaktivasyonunun en iyi hangi sürede gerçekleştiğini belirlemek amacıyla zamana karşı yapılan analiz sonucunda, 10mM CDME muamelesini takibenki 30. dakikadan itibaren %80 oranında inhibisyonun başladığı ve 120. Dakikaya kadar aynı oranda sabit kaldığı

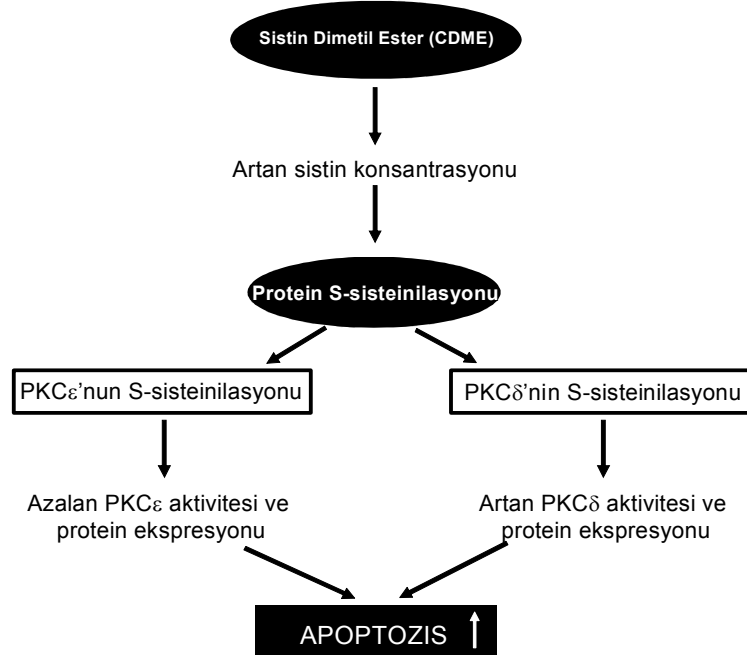
saptanmıştır. Chu ve arkadaşlarının elde ettiği bu bulgu baz alınarak, çalışmamızda prostat hücrelerinin muamele edildiği CDME'nin süresi yaptığımız ön çalışmalar sonucunda 90 dakika olarak belirlendi. CDME indüklü PKCε inaktivasyonuna ek olarak, aynı araştırmacılar PKCδ plazmidi ile transfekte ettikleri COS-7 hücrelerinde CDME ve sistamin indüklü PKCδ aktivite değişimlerini incelemişlerdir. 0.025, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5 ve 10mM olmak üzere 9 farklı konsantrasyondaki CDME ve sistamin ile hücrelerin muamele edilmesi sonucunda, 0.25-0.5mM CDME'nin herhangi bir muamelenin olmadığı duruma kıyasla PKCδ aktivasyonunda 2 katlık bir artışa neden olmasına karşılık sistaminin ise belirgin bir değişime yol açmadığı saptanmıştır. Chu ve arkadaşları tarafından daha önce yapılan bir çalışmada [8], PKCδ'nin aktivasyonu ve PKCε'nun inaktivasyonu üzerinde sistaminin sistinden daha etkin olduğu saptanmasına karşılık, aynı araştırmacıların yaptıkları yukarıda bahsedilen son çalışmanın bulgularına göre ise bir sistin prekürsörü olan CDME'nin sistaminden de daha etkin olduğu kanıtlanmıştır. Bunun nedeni olarak, lipofilik karakterde olan CDME'nin sistamine göre hücre içerisine daha kolay alınması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bunun dışında CDME'nin hücre esterazlar tarafından sistine hidrolize edilmesine fırsat kalmadan hızlı bir şekilde lipofilik CDME'nin PKC izozimlerinin katalitik veya regülatör birimlerinin hidrofobik kısımları ile ilişkiye girmesi de CDME'nin etkinliğini açıklayan faktörlerden birisidir. CDME, PKCδ'nin C1 biriminde bulunan sistince zengin fosfolipid bağlayıcı cepler ile interaksiyona girer ve bu da hücresel PKCδ'nin oksidatif indüksiyonuna aracılık etmektedir [121]. Daha önce bahsedildiği gibi, C1 birimi tümör promotörleri olan forbol esterler için bağlanma bölgesi olmasından dolayı CDME'nin bu bölgeye bağlanması forbol ester indüklü tümör progresyonunu önemli ölçüde azalmasına neden olmaktadır.



Şekil 5.1. CDME'nin moleküler yapısı.

Prostat kanserinin progresyonunun önlenmesi için, CDME tarafından indüklenen PKCδ aktivasyonunun ve PKCε inaktivasyonunun prostat kanseri hücrelerinin apoptozisini indükleyip indüklediğini incelemek amacıyla yaptığımız Kalsein-AM ve DNA fragmentasyonu deneyleri sonucunda, apoptozisin 0.5 mM ve 5 mM CDME muamelesini takiben doza bağlı olarak arttığı gözlemlendi. Burada dikkat çekilmesi gereken nokta ise, bu apoptozisin artış oranının nontümörijenik prostat epitelyum hücresi olan RWPE-1'a kıyasla androjen-bağımlı LNCaP ve -bağımsız PC3 olmak üzere iki farklı prostat kanseri hücrelerinde daha fazla olmasıdır. 5mM CDME uyarımı, RWPE-1'de %20'lik bir apoptotik artışa neden olurken bu oran PC3 ve LNCaP'de sırasıyla %75 ve %81'dir (kontrol hücrenin yaklaşık 3.5-4 katı kadar). Bunun dışında iki prostat kanseri hücresini birbiri ile kıyasladığımızda PC3'nin LNCaP'e göre apoptozise daha dirençli olduğunu saptadık. Bu sonuç CDME indüklü PKCδ aktivasyonu ve PKCε inaktivasyonu

ile ilgili sonuçlar ile paralellik göstererek, prostat kanserinin en agresif hücre tipi olan PC3'nin CDME indüklü hem PKC regülasyonuna hem de apoptozise karşı daha az hassasiyete sahip olduğunu göstermiştir. Yaptığımız analizler ışığında elde ettiğimiz genel yorum, Şekil 5.2.'de şematize edilerek özetlenmiştir.



Şekil 5.2. LNCaP ve PC3 hücrelerinde CDME indüksiyonu takibinde gelişen PKCδ aktivasyonu/ PKCε inaktivasyonu ve apoptozis

Prostat kanserinde CDME indüklü hücre ölümünün PKCδ aracılı olduğu, çalışmamızda PKCδ genine spesifik siRNA'ların kullanılması ile ayrıca gösterilmiştir. PRKCD-siRNA ile transfekte edilen prostat hücrelerinde, PRKCD mRNA'sının degrade olduğu RT-PCR analizi sonucunda gözlenmesini takiben yapılan tripan-mavi deneyleri sonucunda, PC3 hücrelerinde CDME uyarımlı hücre canlılığının PKCδ yokluğunda arttığı saptanmıştır. Yani PC3 hücrelerinin PKCδ'a spesifik siRNA ile ve ayrıca negatif siRNA ile transfekte edildiği durumlarda tespit edilen hücre ölüm oranları kıyaslandığında CDME'nin, PKCδ yokluğunda prostat kanseri hücrelerinin ölümünü %13 oranında azalttığını belirledik. Bu sonuç da PKCδ'nın, CDME indüklü prostat kanser hücrelerinin apoptozisinde önemli bir rol oynadığını açıkça ifade etmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara dayanarak, bir sistin prekürsörü olan CDME, hem androjen-bağımlı hem de androjen-bağımsız prostat epitelyum kanser hücrelerinin apoptozisini uyararak tümör progresyonunu önlemiştir. Ancak önemli olan nokta bunun nontümörjenik prostat epitelyum hücresinde çok az miktarda olmasıdır. Yaptığımız ileri analizler, CDME'nin bu etkiyi prostat kanserinin

progresyonunda tam ters etkilere sahip olan PKC δ ve PKC ϵ üzerinden gerekleştigini göstermiştir. Her iki prostat kanser hücresinde CDME'nin, prostat kanserinde ekspresyonu ve aktivitesi azalan pro-apoptotik PKC δ 'nın aktive olmasına, tam tersi olarak ekspresyonu ve aktivitesi artan onkojenik PKC ϵ 'nin ise inaktive olmasına neden olduğunu saptadık. Dolayısıyla CDME, prostat kanserinin önlenmesi için her iki PKC izozimi regüle ederek, enzimleri asıl istenilen fonksiyonlara tekrar kavuşmasını sağlamıştır. Lipofilik yapısından dolayı CDME'nin hem hücreler tarafından daha kolay alınması hem de enzimin katalitik ve regülatör birimlerindeki hidrofobik kısımlar ile interaksiyona girmesi, CDME'yi diğer disülfid ajanlarına göre PKC regülasyonunda daha efektif kılmaktadır. CDME'nin, PKC δ ve PKC ϵ enzimlerinin yapısında bulunan anahtar fonksiyona sahip redoks sensitiv bir sistein birimini S-sisteinilasyona uğratması, her iki enzimin kanserde bozulan fonksiyonlarını düzeltmek için yeterli olmaktadır. Apoptozisde kaydedilen verilerde olduğu gibi, CDME'nin bu iki PKC izozimi üzerindeki regüle etkisi yine kontrol hücrenin aksine belirgin olarak her iki prostat kanseri hücresinde ortaya çıkmıştır. Bu sonuç prostat kanserinin tedavisi açısından oldukça önemlidir. Çünkü genel olarak kanser tedavilerinde karşılaşılan en önemli sorun, verilen terapötik ajanın kanser hücrelerini öldürdüğü gibi normal hücrelere de zarar vermesidir. CDME'nin kontrol hücreye kıyasla prostat kanseri hücrelerindeki belirgin etkisi, CDME'nin prostat kanseri tedavisinde kullanılacak olası terapötik ajanlardan biri olabileceğini göstermektedir. CDME'nin PKC δ aktivasyonu ve PKC ϵ inaktivasyonu üzerinden prostat kanseri progresyonunu önlediği ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir. Bu nedenle elde ettiğimiz etkili sonuçların, sonraki çalışmalarımıza ve diğer araştırmacılara yeni fikirler vereceğini düşünmekteyiz. Prostat kanserinin tedavisi için, CDME'nin PKC yapısında ilişkiye girdiği anahtar öneme sahip sistein birimlerinin tanımlanması ve bu birimlere spesifik terapötik ajanların dizayn edilmesi çok daha verimli tedavi sonuçları sağlayacaktır.

SONUÇLAR

Bulduğumuz deneysel verilere göre sonuçlarımızı şu şekilde özetleyebiliriz:

- 1) Nontümörjenik prostat epitelyum hücresi RWPE-1'in, androjen-bağımlı prostat kanser hücresi LNCaP'nin ve androjen-bağımsız prostat kanser hücresi PC3'ün 0.5mM ve 5mM CDME ile muamele edilmesi sonucunda, hücre içi sistin düzeyleri her üç hücre dizisinde de CDME dozundaki artışa paralel olarak belirgin bir biçimde artmıştır.
- 2) CDME'nin etkilerini tersinir olarak düzenlemesi amacıyla yapılan DTT muamelesi sonucunda ise, her üç prostat hücre dizisinde CDME-indüklü hücre içi sistin düzeylerinin artışı baskılanmıştır.
- 3) CDME, kontrol hücre olan RWPE-1'in aksine hem LNCaP'de hem de PC3'de programlı hücre ölümünü indüklemiştir. Bu artış, uygulanan 0.5mM ve 5mM CDME dozlarındaki artış ile paralellik göstermiştir. İki farklı prostat kanser hücresi birbiri ile kıyaslandığında ise, apoptotik orandaki artış PC3'e nazaran LNCaP'de daha fazladır.
- 4) PKC δ enzim ekspresyonunun gen düzeyinde inhibe edilmesi amacıyla PKC δ mRNA'sına spesifik siRNA ile transfekte edilen kontrol ve androjen bağımsız prostat kanseri hücrelerinde CDME'nin, kontrol hücreye kıyasla PC3'de hücre ölüm oranını azalttığı saptanmıştır. PKC δ geninin inhibe edildiği şartlarda gözlenen bu azalış, CDME-indüklü hücre ölümünün androjen-bağımsız prostat kanseri hücrelerinde PKC δ 'a bağımlı olduğunu kanıtlamıştır.
- 5) Kontrol hücreye kıyasla hem androjen-bağımlı hem de androjen-bağımsız prostat kanseri hücrelerinde, PKC δ 'nın ekspresyonu ve aktivitesi azalmıştır. İki farklı prostat kanseri hücresi birbiri ile kıyaslandığında ise, hem ekspresyon hem de aktivite yönünden PKC δ 'daki azalış PC3 hücresinde daha belirgindir.
- 6) RWPE-1'e kıyasla hem LNCaP'de hem de PC3'de PKC ϵ ekspresyonu ve aktivitesi artmıştır. PKC ϵ 'nin hem ekspresyonunda hem de aktivitesinde gözlenen bu artış ise, prostat kanseri hücrelerinden PC3'de daha fazladır.
- 7) 0.5mM CDME, nontümörjenik prostat hücresinde PKC δ protein ekspresyonunu ve aktivitesini azaltmıştır. Böylelikle CDME, sağlıklı prostat hücrelerinin apoptozdan korunmasını sağlamıştır.
- 8) 0.5mM CDME, prostat kanseri hücrelerinde azalan pro-apoptotik PKC δ enziminin, hem ekspresyonunu hem de aktivitesini arttırmıştır. CDME, PKC δ üzerinde regülatör yöndeki etkisini kontrol hücrenin aksine, her iki prostat kanseri hücresinde özellikle de androjen-bağımlı olan kanser hücresi tipinde göstermiştir.

- 9) 5mM CDME, prostat kanseri hücrelerinde artan onkojenik PKC ϵ enziminin hem ekspresyonunu hem de aktivitesini inaktive etmiştir. CDME PKC ϵ üzerinde regülatör yöndeki etkisini kontrol hücrenin aksine, her iki prostat kanseri hücresinde özellikle de androjen-bağımlı olan hücre tipinde göstermiştir.
- 10) Kontrol ve prostat kanseri hücrelerinin CDME muamelesine verdiği yanıt kıyaslandığında, kontrol hücrenin aksine kanser hücrelerinin CDME'e karşı bir hassasiyete sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu hassasiyet, PC3'e nazaran LNCaP'nin hücrel yanıtlarında çok daha belirgin bir biçimde ortaya çıkmıştır.
- 11) Prostat kanseri hücrelerinde PKC δ 'nın aktivasyonuna ve PKC ϵ 'nin inaktivasyonuna neden olan CDME'nin bu iki PKC izozimi üzerindeki regülatör etkinliği kıyaslandığında, PKC δ 'nın CDME indüksiyonuna karşılık daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. PKC δ 'ya nazaran daha agresif karakterde olan onkojenik PKC ϵ ise CDME tarafından regüle edilebilmesi için daha yüksek CDME dozlarına ihtiyaç duymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M. J. (2008) Cancer statistics, *CA Cancer J Clin* 58, 71-96.
2. McCormick, F. (1999) Signalling networks that cause cancer, *Trends Cell Biol* 9, M53-56.
3. Marcelli, M., Ittmann, M., Mariani, S., Sutherland, R., Nigam, R., Murthy, L., Zhao, Y., DiConcini, D., Puxeddu, E., Esen, A., Eastham, J., Weigel, N. L., Lamb, D. J. (2000) Androgen receptor mutations in prostate cancer, *Cancer Res* 60, 944-949.
4. Cairns, P., Okami, K., Halachmi, S., Halachmi, N., Esteller, M., Herman, J. G., Jen, J., Isaacs, W. B., Bova, G. S., Sidransky, D. (1997) Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer, *Cancer Res* 57, 4997-5000.
5. Koivunen, J., Aaltonen, V., Peltonen, J. (2006) Protein kinase C (PKC) family in cancer progression, *Cancer Lett* 235, 1-10.
6. Griner, E. M., Kazanietz, M. G. (2007) Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer, *Nat Rev Cancer* 7, 281-294.
7. Gopalakrishna, R., Jaken, S. (2000) Protein kinase C signaling and oxidative stress, *Free Radic Biol Med* 28, 1349-1361.
8. Chu, F., Ward, N. E., O'Brian, C. A. (2003) PKC isozyme S-cysteinylation by cystine stimulates the pro-apoptotic isozyme PKC delta and inactivates the oncogenic isozyme PKC epsilon, *Carcinogenesis* 24, 317-325.
9. Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell* 100, 57-70.
10. Makarov, D. V., Carter, H. B. (2006) The discovery of prostate specific antigen as a biomarker for the early detection of adenocarcinoma of the prostate, *J Urol* 176, 2383-2385.
11. Stephenson RA, S. C., Mineau GP. . (1995) The fall in incidence of prostate carcinoma, *Cancer* 77, 1342-1348.
12. Ahn, J., Albanes, D., Peters, U., Schatzkin, A., Lim, U., Freedman, M., Chatterjee, N., Andriole, G. L., Leitzmann, M. F., Hayes, R. B. (2007) Dairy products, calcium intake, and risk of prostate cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 2623-2630.
13. Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher, *Arch Biochem Biophys* 274, 532-538.
14. Ross, R. K., Bernstein, L., Lobo, R. A., Shimizu, H., Stanczyk, F. Z., Pike, M. C., Henderson, B. E. (1992) 5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males, *Lancet* 339, 887-889.

15. Carter, B. S., Bova, G. S., Beaty, T. H., Steinberg, G. D., Childs, B., Isaacs, W. B., Walsh, P. C. (1993) Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features, *J Urol* 150, 797-802.
16. Smith, J. R., Freije, D., Carpten, J. D., Gronberg, H., Xu, J., Isaacs, S. D., Brownstein, M. J., Bova, G. S., Guo, H., Bujnovszky, P., Nusskern, D. R., Damber, J. E., Bergh, A., Emanuelsson, M., Kallioniemi, O. P., Walker-Daniels, J., Bailey-Wilson, J. E., Beaty, T. H., Meyers, D. A., Walsh, P. C., Collins, F. S., Trent, J. M., Isaacs, W. B. (1996) Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search, *Science* 274, 1371-1374.
17. Xu, J., Meyers, D., Freije, D., Isaacs, S., Wiley, K., Nusskern, D., Ewing, C., Wilkens, E., Bujnovszky, P., Bova, G. S., Walsh, P., Isaacs, W., Schleutker, J., Matikainen, M., Tammela, T., Visakorpi, T., Kallioniemi, O. P., Berry, R., Schaid, D., French, A., McDonnell, S., Schroeder, J., Blute, M., Thibodeau, S., Gronberg, H., Emanuelsson, M., Damber, J. E., Bergh, A., Jonsson, B. A., Smith, J., Bailey-Wilson, J., Carpten, J., Stephan, D., Gillanders, E., Amundson, I., Kainu, T., Freas-Lutz, D., Baffoe-Bonnie, A., Van Aucken, A., Sood, R., Collins, F., Brownstein, M., Trent, J. (1998) Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome, *Nat Genet* 20, 175-179.
18. Ford, D., Easton, D. F., Bishop, D. T., Narod, S. A., Goldgar, D. E. (1994) Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium, *Lancet* 343, 692-695.
19. (1999) Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. The Breast Cancer Linkage Consortium, *J Natl Cancer Inst* 91, 1310-1316.
20. Berry, R., Schaid, D. J., Smith, J. R., French, A. J., Schroeder, J. J., McDonnell, S. K., Peterson, B. J., Wang, Z. Y., Carpten, J. D., Roberts, S. G., Tester, D. J., Blute, M. L., Trent, J. M., Thibodeau, S. N. (2000) Linkage analyses at the chromosome 1 loci 1q24-25 (HPC1), 1q42.2-43 (PCAP), and 1p36 (CAPB) in families with hereditary prostate cancer, *Am J Hum Genet* 66, 539-546.
21. Rokman, A., Ikonen, T., Mononen, N., Autio, V., Matikainen, M. P., Koivisto, P. A., Tammela, T. L., Kallioniemi, O. P., Schleutker, J. (2001) ELAC2/HPC2 involvement in hereditary and sporadic prostate cancer, *Cancer Res* 61, 6038-6041.
22. Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M. V., Radmayr, C., Hittmair, A., Zhang, J., Thurnher, M., Bartsch, G., Klocker, H. (1996) Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors, *Prostate* 28, 392-405.
23. Gnanapragasam, V. J., McCahy, P. J., Neal, D. E., Robson, C. N. (2000) Insulin-like growth factor II and androgen receptor expression in the prostate, *BJU Int* 86, 731-735.
24. Giri, D., Ozen, M., Ittmann, M. (2001) Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer, *Am J Pathol* 159, 2159-2165.
25. Lattouf, J. B., Srinivasan, R., Pinto, P. A., Linehan, W. M., Neckers, L. (2006) Mechanisms of disease: the role of heat-shock protein 90 in genitourinary malignancy, *Nat Clin Pract Urol* 3, 590-601.

26. Kambhampati, S., Ray, G., Sengupta, K., Reddy, V. P., Banerjee, S. K., Van Veldhuizen, P. J. (2005) Growth factors involved in prostate carcinogenesis, *Front Biosci* 10, 1355-1367.
27. Wolk, A., Andersson, S. O., Mantzoros, C. S., Trichopoulos, D., Adami, H. O. (2000) Can measurements of IGF-1 and IGFBP-3 improve the sensitivity of prostate-cancer screening?, *Lancet* 356, 1902-1903.
28. Cho, N. Y., Choi, M., Kim, B. H., Cho, Y. M., Moon, K. C., Kang, G. H. (2006) BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma, *Int J Cancer* 119, 1858-1862.
29. Bakin, R. E., Gioeli, D., Sikes, R. A., Bissonette, E. A., Weber, M. J. (2003) Constitutive activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway promotes androgen hypersensitivity in LNCaP prostate cancer cells, *Cancer Res* 63, 1981-1989.
30. Gioeli, D., Mandell, J. W., Petroni, G. R., Frierson, H. F., Jr., Weber, M. J. (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression, *Cancer Res* 59, 279-284.
31. Zhou, J., Scholes, J., Hsieh, J. T. (2001) Signal transduction targets in androgen-independent prostate cancer, *Cancer Metastasis Rev* 20, 351-362.
32. Karin, M. (2006) Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression, *Nature* 441, 431-436.
33. Suh, J., Rabson, A. B. (2004) NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon?, *J Cell Biochem* 91, 100-117.
34. Zhang, L., Altuwajri, S., Deng, F., Chen, L., Lal, P., Bhanot, U. K., Korets, R., Wenske, S., Lilja, H. G., Chang, C., Scher, H. I., Gerald, W. L. (2009) NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth, *Am J Pathol* 175, 489-499.
35. McPhie, D. L., Coopersmith, R., Hines-Peralta, A., Chen, Y., Ivins, K. J., Manly, S. P., Kozlowski, M. R., Neve, K. A., Neve, R. L. (2003) DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3, *J Neurosci* 23, 6914-6927.
36. Kerr, J. F., Winterford, C. M., Harmon, B. V. (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy, *Cancer* 73, 2013-2026.
37. Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., Adjei, A. A. (2005) Targeting apoptosis pathways in cancer therapy, *CA Cancer J Clin* 55, 178-194.
38. Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor, *Cell* 88, 355-365.
39. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis, *Cell* 89, 175-184.
40. Zapata, J. M., Pawlowski, K., Haas, E., Ware, C. F., Godzik, A., Reed, J. C. (2001) A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains, *J Biol Chem* 276, 24242-24252.
41. Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R. D., Korsmeyer, S. J. (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death, *Nature* 348, 334-336.

42. Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis, *Nature* 407, 770-776.
43. Colombel, M., Symmans, F., Gil, S., O'Toole, K. M., Chopin, D., Benson, M., Olsson, C. A., Korsmeyer, S., Buttyan, R. (1993) Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers, *Am J Pathol* 143, 390-400.
44. Raffo, A. J., Perlman, H., Chen, M. W., Day, M. L., Streitman, J. S., Buttyan, R. (1995) Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo, *Cancer Res* 55, 4438-4445.
45. Winter, R. N., Kramer, A., Borkowski, A., Kyprianou, N. (2001) Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer, *Cancer Res* 61, 1227-1232.
46. Biroccio, A., Leonetti, C. (2004) Telomerase as a new target for the treatment of hormone-refractory prostate cancer, *Endocr Relat Cancer* 11, 407-421.
47. Song, J. Z., Stirzaker, C., Harrison, J., Melki, J. R., Clark, S. J. (2002) Hypermethylation trigger of the glutathione-S-transferase gene (GSTP1) in prostate cancer cells, *Oncogene* 21, 1048-1061.
48. Steck, P. A., Pershouse, M. A., Jasser, S. A., Yung, W. K., Lin, H., Ligon, A. H., Langford, L. A., Baumgard, M. L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D. H., Tavtigian, S. V. (1997) Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers, *Nat Genet* 15, 356-362.
49. Aaltomaa, S., Lipponen, P., Eskelinen, M., Ala-Opas, M., Kosma, V. M. (1999) Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer, *Prostate* 39, 8-15.
50. Eagle, L. R., Yin, X., Brothman, A. R., Williams, B. J., Atkin, N. B., Prochownik, E. V. (1995) Mutation of the MXII gene in prostate cancer, *Nat Genet* 9, 249-255.
51. Yoshino, T., Shiina, H., Urakami, S., Kikuno, N., Yoneda, T., Shigeno, K., Igawa, M. (2006) Bcl-2 expression as a predictive marker of hormone-refractory prostate cancer treated with taxane-based chemotherapy, *Clin Cancer Res* 12, 6116-6124.
52. Koivisto, P. A., Rantala, I. (1999) Amplification of the androgen receptor gene is associated with P53 mutation in hormone-refractory recurrent prostate cancer, *J Pathol* 187, 237-241.
53. Duque, J. L., Loughlin, K. R., Adam, R. M., Kantoff, P. W., Zurakowski, D., Freeman, M. R. (1999) Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer, *Urology* 54, 523-527.
54. Wilson, S. R., Gallagher, S., Warpeha, K., Hawthorne, S. J. (2004) Amplification of MMP-2 and MMP-9 production by prostate cancer cell lines via activation of protease-activated receptors, *Prostate* 60, 168-174.
55. Umbas, R., Schalken, J. A., Aalders, T. W., Carter, B. S., Karthaus, H. F., Schaafsma, H. E., Debruyne, F. M., Isaacs, W. B. (1992) Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer, *Cancer Res* 52, 5104-5109.

56. Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., Nishizuka, Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain, *J Biol Chem* 252, 7610-7616.
57. Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion, *Nature* 308, 693-698.
58. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters, *J Biol Chem* 257, 7847-7851.
59. Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C, *Science* 258, 607-614.
60. Mellor, H., Parker, P. J. (1998) The extended protein kinase C superfamily, *Biochem J* 332 (Pt 2), 281-292.
61. Newton, A. C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation, *J Biol Chem* 270, 28495-28498.
62. Zhang, G., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Hurley, J. H. (1995) Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester, *Cell* 81, 917-924.
63. Newton, A. C. (1995) Protein kinase C. Seeing two domains, *Curr Biol* 5, 973-976.
64. Taylor, S. S., Radzio-Andzelm, E. (1994) Three protein kinase structures define a common motif, *Structure* 2, 345-355.
65. Wang, Q. J., Lu, G., Schlapkohl, W. A., Goerke, A., Larsson, C., Mischak, H., Blumberg, P. M., Mushinski, J. F. (2004) The V5 domain of protein kinase C plays a critical role in determining the isoform-specific localization, translocation, and biological function of protein kinase C-delta and -epsilon, *Mol Cancer Res* 2, 129-140.
66. Chen, J. L., Lin, H. H., Kim, K. J., Lin, A., Ou, J. H., Ann, D. K. (2009) PKC delta signaling: a dual role in regulating hypoxic stress-induced autophagy and apoptosis, *Autophagy* 5, 244-246.
67. Acevedo-Duncan, M., Patel, R., Whelan, S., Bicaku, E. (2002) Human glioma PKC-iota and PKC-betaII phosphorylate cyclin-dependent kinase activating kinase during the cell cycle, *Cell Prolif* 35, 23-36.
68. Samuels, D. S., Shimizu, Y., Shimizu, N. (1989) Protein kinase C phosphorylates DNA topoisomerase I, *FEBS Lett* 259, 57-60.
69. Oubaha, M., Gratton, J. P. (2009) Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by atypical PKC zeta contributes to angiotensin-1-dependent inhibition of VEGF-induced endothelial permeability in vitro, *Blood* 114, 3343-3351.
70. Hundle, B., McMahon, T., Dadgar, J., Messing, R. O. (1995) Overexpression of epsilon-protein kinase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth, *J Biol Chem* 270, 30134-30140.
71. Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K., Ohno, S. (1996) Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf, *J Biol Chem* 271, 23512-23519.

72. Milne, D. M., McKendrick, L., Jardine, L. J., Deacon, E., Lord, J. M., Meek, D. W. (1996) Murine p53 is phosphorylated within the PAb421 epitope by protein kinase C in vitro, but not in vivo, even after stimulation with the phorbol ester o-tetradecanoylphorbol 13-acetate, *Oncogene 13*, 205-211.
73. Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., Rapp, U. R. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation, *Nature 364*, 249-252.
74. Uddin, S., Sassano, A., Deb, D. K., Verma, A., Majchrzak, B., Rahman, A., Malik, A. B., Fish, E. N., Plataniias, L. C. (2002) Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727, *J Biol Chem 277*, 14408-14416.
75. Koren, R., Ben Meir, D., Langzam, L., Dekel, Y., Konichezky, M., Baniel, J., Livne, P. M., Gal, R., Sampson, S. R. (2004) Expression of protein kinase C isoenzymes in benign hyperplasia and carcinoma of prostate, *Oncol Rep 11*, 321-326.
76. McJilton, M. A., Van Sikes, C., Wescott, G. G., Wu, D., Foreman, T. L., Gregory, C. W., Weidner, D. A., Harris Ford, O., Morgan Lasater, A., Mohler, J. L., Terrian, D. M. (2003) Protein kinase Cepsilon interacts with Bax and promotes survival of human prostate cancer cells, *Oncogene 22*, 7958-7968.
77. Mischak, H., Goodnight, J. A., Kolch, W., Martiny-Baron, G., Schaechtel, C., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Pierce, J. H., Mushinski, J. F. (1993) Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity, *J Biol Chem 268*, 6090-6096.
78. Lu, Z., Liu, D., Hornia, A., Devonish, W., Pagano, M., Foster, D. A. (1998) Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation, *Mol Cell Biol 18*, 839-845.
79. Ruvolo, P. P., Deng, X., Carr, B. K., May, W. S. (1998) A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis, *J Biol Chem 273*, 25436-25442.
80. Gubina, E., Rinaudo, M. S., Szallasi, Z., Blumberg, P. M., Mufson, R. A. (1998) Overexpression of protein kinase C isoform epsilon but not delta in human interleukin-3-dependent cells suppresses apoptosis and induces bcl-2 expression, *Blood 91*, 823-829.
81. Jamieson, L., Carpenter, L., Biden, T. J., Fields, A. P. (1999) Protein kinase C activity is necessary for Bcr-Abl-mediated resistance to drug-induced apoptosis, *J Biol Chem 274*, 3927-3930.
82. Kaasinen, S. K., Goldsteins, G., Alhonen, L., Janne, J., Koistinaho, J. (2002) Induction and activation of protein kinase C delta in hippocampus and cortex after kainic acid treatment, *Exp Neurol 176*, 203-212.
83. Datta, R., Kojima, H., Yoshida, K., Kufe, D. (1997) Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis, *J Biol Chem 272*, 20317-20320.

84. Endo, K., Oki, E., Biedermann, V., Kojima, H., Yoshida, K., Johannes, F. J., Kufe, D., Datta, R. (2000) Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C [micro] by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents, *J Biol Chem* 275, 18476-18481.
85. Majumder, P. K., Pandey, P., Sun, X., Cheng, K., Datta, R., Saxena, S., Kharbanda, S., Kufe, D. (2000) Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis, *J Biol Chem* 275, 21793-21796.
86. Fujii, T., Garcia-Bermejo, M. L., Bernabo, J. L., Caamano, J., Ohba, M., Kuroki, T., Li, L., Yuspa, S. H., Kazanietz, M. G. (2000) Involvement of protein kinase C delta (PKCdelta) in phorbol ester-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. Lack of proteolytic cleavage of PKCdelta, *J Biol Chem* 275, 7574-7582.
87. Chen, N., Ma, W., Huang, C., Dong, Z. (1999) Translocation of protein kinase Cepsilon and protein kinase Cdelta to membrane is required for ultraviolet B-induced activation of mitogen-activated protein kinases and apoptosis, *J Biol Chem* 274, 15389-15394.
88. Li, L., Lorenzo, P. S., Bogi, K., Blumberg, P. M., Yuspa, S. H. (1999) Protein kinase Cdelta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector, *Mol Cell Biol* 19, 8547-8558.
89. Denning, M. F., Wang, Y., Tibudan, S., Alkan, S., Nickoloff, B. J., Qin, J. Z. (2002) Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase C, *Cell Death Differ* 9, 40-52.
90. Yuan, Z. M., Utsugisawa, T., Ishiko, T., Nakada, S., Huang, Y., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., Kufe, D. (1998) Activation of protein kinase C delta by the c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation, *Oncogene* 16, 1643-1648.
91. Kajimoto, T., Ohmori, S., Shirai, Y., Sakai, N., Saito, N. (2001) Subtype-specific translocation of the delta subtype of protein kinase C and its activation by tyrosine phosphorylation induced by ceramide in HeLa cells, *Mol Cell Biol* 21, 1769-1783.
92. Zrachia, A., Dobroslav, M., Blass, M., Kazimirsky, G., Kronfeld, I., Blumberg, P. M., Kobilier, D., Lustig, S., Brodie, C. (2002) Infection of glioma cells with Sindbis virus induces selective activation and tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. Implications for Sindbis virus-induced apoptosis, *J Biol Chem* 277, 23693-23701.
93. Sumitomo, M., Ohba, M., Asakuma, J., Asano, T., Kuroki, T., Hayakawa, M. (2002) Protein kinase Cdelta amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells, *J Clin Invest* 109, 827-836.
94. Bharti, A., Kraeft, S. K., Gounder, M., Pandey, P., Jin, S., Yuan, Z. M., Lees-Miller, S. P., Weichselbaum, R., Weaver, D., Chen, L. B., Kufe, D., Kharbanda, S. (1998) Inactivation of DNA-dependent protein kinase by protein kinase Cdelta: implications for apoptosis, *Mol Cell Biol* 18, 6719-6728.

95. Cross, T., Griffiths, G., Deacon, E., Sallis, R., Gough, M., Watters, D., Lord, J. M. (2000) PKC-delta is an apoptotic lamin kinase, *Oncogene* 19, 2331-2337.
96. Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W. W., Kamen, R., Weichselbaum, R., et al. (1995) Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells, *EMBO J* 14, 6148-6156.
97. Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R. V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W., Kufe, D. (1996) Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis, *J Exp Med* 184, 2399-2404.
98. Huang, S., Bucana, C. D., Van Arsdall, M., Fidler, I. J. (2002) Stat1 negatively regulates angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of tumor cells, *Oncogene* 21, 2504-2512.
99. Ren, J., Datta, R., Shioya, H., Li, Y., Oki, E., Biedermann, V., Bharti, A., Kufe, D. (2002) p73beta is regulated by protein kinase Cdelta catalytic fragment generated in the apoptotic response to DNA damage, *J Biol Chem* 277, 33758-33765.
100. Basu, A., Akkaraju, G. R. (1999) Regulation of caspase activation and cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cell death by protein kinase C, *Biochemistry* 38, 4245-4251.
101. Matassa, A. A., Carpenter, L., Biden, T. J., Humphries, M. J., Reyland, M. E. (2001) PKCdelta is required for mitochondrial-dependent apoptosis in salivary epithelial cells, *J Biol Chem* 276, 29719-29728.
102. Brodie, C., Blumberg, P. M. (2003) Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta, *Apoptosis* 8, 19-27.
103. Watanabe, T., Ono, Y., Taniyama, Y., Hazama, K., Igarashi, K., Ogita, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (1992) Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10159-10163.
104. Fukumoto, S., Nishizawa, Y., Hosoi, M., Koyama, H., Yamakawa, K., Ohno, S., Morii, H. (1997) Protein kinase C delta inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by suppressing G1 cyclin expression, *J Biol Chem* 272, 13816-13822.
105. Wakino, S., Kintscher, U., Liu, Z., Kim, S., Yin, F., Ohba, M., Kuroki, T., Schonthal, A. H., Hsueh, W. A., Law, R. E. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit mitogenic induction of p21(Cip1) by modulating the protein kinase Cdelta pathway in vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem* 276, 47650-47657.
106. Shanmugam, M., Krett, N. L., Maizels, E. T., Murad, F. M., Rosen, S. T., Hunzicker-Dunn, M. (2001) A role for protein kinase C delta in the differential sensitivity of MCF-7 and MDA-MB 231 human breast cancer cells to phorbol ester-induced growth arrest and p21(WAF1/CIP1) induction, *Cancer Lett* 172, 43-53.

107. LaGory, E. L., Sitailo, L. A., Denning, M. F. The protein kinase Cdelta catalytic fragment is critical for maintenance of the G2/M DNA damage checkpoint, *J Biol Chem* 285, 1879-1887.
108. Baxter, G., Oto, E., Daniel-Issakani, S., Strulovici, B. (1992) Constitutive presence of a catalytic fragment of protein kinase C epsilon in a small cell lung carcinoma cell line, *J Biol Chem* 267, 1910-1917.
109. Wang, Q. J., Acs, P., Goodnight, J., Blumberg, P. M., Mischak, H., Mushinski, J. F. (1998) The catalytic domain of PKC-epsilon, in reciprocal PKC-delta and -epsilon chimeras, is responsible for conferring tumorigenicity to NIH3T3 cells, whereas both regulatory and catalytic domains of PKC-epsilon contribute to in vitro transformation, *Oncogene* 16, 53-60.
110. Okhrimenko, H., Lu, W., Xiang, C., Hamburger, N., Kazimirsky, G., Brodie, C. (2005) Protein kinase C-epsilon regulates the apoptosis and survival of glioma cells, *Cancer Res* 65, 7301-7309.
111. Ding, L., Wang, H., Lang, W., Xiao, L. (2002) Protein kinase C-epsilon promotes survival of lung cancer cells by suppressing apoptosis through dysregulation of the mitochondrial caspase pathway, *J Biol Chem* 277, 35305-35313.
112. Shinohara, H., Kayagaki, N., Yagita, H., Oyaizu, N., Ohba, M., Kuroki, T., Ikawa, Y. (2001) A protective role of PKCepsilon against TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in glioma cells, *Biochem Biophys Res Commun* 284, 1162-1167.
113. Basu, A., Lu, D., Sun, B., Moor, A. N., Akkaraju, G. R., Huang, J. (2002) Proteolytic activation of protein kinase C-epsilon by caspase-mediated processing and transduction of antiapoptotic signals, *J Biol Chem* 277, 41850-41856.
114. Cacace, A. M., Ueffing, M., Philipp, A., Han, E. K., Kolch, W., Weinstein, I. B. (1996) PKC epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase, *Oncogene* 13, 2517-2526.
115. Lu, D., Huang, J., Basu, A. (2006) Protein kinase Cepsilon activates protein kinase B/Akt via DNA-PK to protect against tumor necrosis factor-alpha-induced cell death, *J Biol Chem* 281, 22799-22807.
116. Basu, A., Sivaprasad, U. (2007) Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision, *Cell Signal* 19, 1633-1642.
117. Wu, D., Foreman, T. L., Gregory, C. W., McJilton, M. A., Wescott, G. G., Ford, O. H., Alvey, R. F., Mohler, J. L., Terrian, D. M. (2002) Protein kinase cepsilon has the potential to advance the recurrence of human prostate cancer, *Cancer Res* 62, 2423-2429.
118. Shankar, E., Sivaprasad, U., Basu, A. (2008) Protein kinase C epsilon confers resistance of MCF-7 cells to TRAIL by Akt-dependent activation of Hdm2 and downregulation of p53, *Oncogene* 27, 3957-3966.
119. Flescher, E., Rotem, R. (2002) Protein kinase C epsilon mediates the induction of P-glycoprotein in LNCaP prostate carcinoma cells, *Cell Signal* 14, 37-43.
120. Biswas, S., Chida, A. S., Rahman, I. (2006) Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling, *Biochem Pharmacol* 71, 551-564.

121. Chu, F., Chen, L. H., O'Brian, C. A. (2004) Cellular protein kinase C isozyme regulation by exogenously delivered physiological disulfides--implications of oxidative protein kinase C regulation to cancer prevention, *Carcinogenesis* 25, 585-596.
122. Coor, C., Salmon, R. F., Quigley, R., Marver, D., Baum, M. (1991) Role of adenosine triphosphate (ATP) and NaK ATPase in the inhibition of proximal tubule transport with intracellular cystine loading, *J Clin Invest* 87, 955-961.
123. Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K. (1996) A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet, *Biol Pharm Bull* 19, 1518-1520.
124. Oshima R, W. R., Furlong C, Schneider J. (1951) The utilization of a cystine binding protein from E. coli for the determination of acid soluble cystine in small physiological samples., *J Biol Chem* 249, 6033-6039.
125. Bharti, A. C., Takada, Y., Shishodia, S., Aggarwal, B. B. (2004) Evidence that receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand can suppress cell proliferation and induce apoptosis through activation of a NF-kappaB-independent and TRAF6-dependent mechanism, *J Biol Chem* 279, 6065-6076.
126. Nyambo, R., Cross, N., Lippitt, J., Holen, I., Bryden, G., Hamdy, F. C., Eaton, C. L. (2004) Human bone marrow stromal cells protect prostate cancer cells from TRAIL-induced apoptosis, *J Bone Miner Res* 19, 1712-1721.
127. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem* 150, 76-85.
128. Nakagawa, M., Oliva, J. L., Kothapalli, D., Fournier, A., Assoian, R. K., Kazanietz, M. G. (2005) Phorbol ester-induced G1 phase arrest selectively mediated by protein kinase C delta-dependent induction of p21, *J Biol Chem* 280, 33926-33934.
129. Zhao, X., Gschwend, J. E., Powell, C. T., Foster, R. G., Day, K. C., Day, M. L. (1997) Retinoblastoma protein-dependent growth signal conflict and caspase activity are required for protein kinase C-signaled apoptosis of prostate epithelial cells, *J Biol Chem* 272, 22751-22757.
130. Tanaka, Y., Gavrielides, M. V., Mitsuuchi, Y., Fujii, T., Kazanietz, M. G. (2003) Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway, *J Biol Chem* 278, 33753-33762.
131. Yin, L., Bannani-Baiti, N., Powell, C. T. (2005) Phorbol ester-induced apoptosis of C4-2 cells requires both a unique and a redundant protein kinase C signaling pathway, *J Biol Chem* 280, 5533-5541.
132. Gonzalez-Guerrico, A. M., Kazanietz, M. G. (2005) Phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells via autocrine activation of the extrinsic apoptotic cascade: a key role for protein kinase C delta, *J Biol Chem* 280, 38982-38991.

133. Chang, Q.,Tepperman, B. L. (2003) Effect of selective PKC isoform activation and inhibition on TNF-alpha-induced injury and apoptosis in human intestinal epithelial cells, *Br J Pharmacol* 140, 41-52.
134. Cornford, P., Evans, J., Dodson, A., Parsons, K., Woolfenden, A., Neoptolemos, J.,Foster, C. S. (1999) Protein kinase C isoenzyme patterns characteristically modulated in early prostate cancer, *Am J Pathol* 154, 137-144.
135. Varga, A., Czifra, G., Tallai, B., Nemeth, T., Kovacs, I., Kovacs, L.,Biro, T. (2004) Tumor grade-dependent alterations in the protein kinase C isoform pattern in urinary bladder carcinomas, *Eur Urol* 46, 462-465.
136. Mandil, R., Ashkenazi, E., Blass, M., Kronfeld, I., Kazimirsky, G., Rosenthal, G., Umansky, F., Lorenzo, P. S., Blumberg, P. M.,Brodie, C. (2001) Protein kinase Calpha and protein kinase Cdelta play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells, *Cancer Res* 61, 4612-4619.
137. D'Costa, A. M., Robinson, J. K., Maududi, T., Chaturvedi, V., Nickoloff, B. J.,Denning, M. F. (2006) The proapoptotic tumor suppressor protein kinase C-delta is lost in human squamous cell carcinomas, *Oncogene* 25, 378-386.
138. Perletti, G. P., Marras, E., Concaro, P., Piccinini, F.,Tashjian, A. H., Jr. (1999) PKCdelta acts as a growth and tumor suppressor in rat colonic epithelial cells, *Oncogene* 18, 1251-1256.
139. Pongracz, J., Clark, P., Neoptolemos, J. P.,Lord, J. M. (1995) Expression of protein kinase C isoenzymes in colorectal cancer tissue and their differential activation by different bile acids, *Int J Cancer* 61, 35-39.
140. Aalinkeel, R., Nair, M. P., Sufrin, G., Mahajan, S. D., Chadha, K. C., Chawda, R. P.,Schwartz, S. A. (2004) Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells, *Cancer Res* 64, 5311-5321.
141. Song, K., Wang, H., Krebs, T. L., Kim, S. J.,Danielpour, D. (2008) Androgenic control of transforming growth factor-beta signaling in prostate epithelial cells through transcriptional suppression of transforming growth factor-beta receptor II, *Cancer Res* 68, 8173-8182.
142. Stahelin, R. V., Digman, M. A., Medkova, M., Ananthanarayanan, B., Melowic, H. R., Rafter, J. D.,Cho, W. (2005) Diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Cepsilon: mechanistic differences between protein kinases Cdelta and Cepsilon, *J Biol Chem* 280, 19784-19793.
143. Sharif, T. R.,Sharif, M. (1999) Overexpression of protein kinase C epsilon in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples, *Int J Oncol* 15, 237-243.
144. Pan, Q., Bao, L. W., Kleer, C. G., Sabel, M. S., Griffith, K. A., Teknos, T. N.,Merajver, S. D. (2005) Protein kinase C epsilon is a predictive biomarker of aggressive breast cancer and a validated target for RNA interference anticancer therapy, *Cancer Res* 65, 8366-8371.
145. Knauf, J. A., Ward, L. S., Nikiforov, Y. E., Nikiforova, M., Puxeddu, E., Medvedovic, M., Liron, T., Mochly-Rosen, D.,Fagin, J. A. (2002) Isozyme-specific abnormalities of PKC in thyroid cancer: evidence for post-transcriptional changes in PKC epsilon, *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2150-2159.

146. Ward, N. E., Stewart, J. R., Ioannides, C. G., O'Brian, C. A. (2000) Oxidant-induced S-glutathiolation inactivates protein kinase C-alpha (PKC-alpha): a potential mechanism of PKC isozyme regulation, *Biochemistry* 39, 10319-10329.
147. Chu, F., Ward, N. E., O'Brian, C. A. (2001) Potent inactivation of representative members of each PKC isozyme subfamily and PKD via S-thiolation by the tumor-promotion/progression antagonist glutathione but not by its precursor cysteine, *Carcinogenesis* 22, 1221-1229.
148. Chu, F., Koomen, J. M., Kobayashi, R., O'Brian, C. A. (2005) Identification of an inactivating cysteine switch in protein kinase Cepsilon, a rational target for the design of protein kinase Cepsilon-inhibitory cancer therapeutics, *Cancer Res* 65, 10478-10485.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Düzce’de doğan Nilgün GÜRBÜZ, ilköğrenimini 1983-1988 yılları arasında Amasya Mehmet Varinli İlköğretim Okulu’nda, ortaokul ve lise öğrenimini ise sırasıyla 1988-1991 ve 1991-1994 yılları arasında Amasya Atatürk Lisesi’nde tamamlamıştır. 1994 yılında Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği (Almanca) bölümünde başladığı üniversite öğrenimini, 1999 yılında tamamlayarak mezun olmuştur. 2000 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans programına kayıt olmuştur ve aynı birimde araştırma görevlisi olarak göreve başlamıştır. 2003 yılında ise aynı yıl ve aynı birimde doktora programına başlayarak eğitimine ve görevine devam etmiştir.

2004-2005 yılları arasında 1 yıl süreyle ABD’de Tulane Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Androloji Klinik ve Araştırma Laboratuvarında çalışarak Prof.Dr. Suresh C. SIKKA yönetiminde doktora tezi ile ilgili araştırmalarda bulunmuştur. 2006 yılında ise doktora tezi ile ilgili çalışmalarını devam ettirmek üzere yine aynı ülkede bulunan Virginia Üniversitesi Tıp Fakültesi Massey Kanser Merkezinde Prof.Dr. Paul DENT yönetiminde çalışmıştır. SCI ve SCI-expanded kapsamındaki bilimsel dergilerde 5 yayını, uluslararası bir yayınevi (Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA) tarafından 2006 yılında basılmış olan “Toxicology of Organophosphates and Carbamate Pesticides” isimli kitapta ise “Reproductive Toxicity of Organophosphate and Carbamate Pesticides” başlıklı bölüm yazarlığı ve ulusal-uluslararası kongrelerde yayımlanmış 15 bildirisi bulunmaktadır. Araştırmacı olarak görev aldığı “Therapeutic effect of combination of alagebrium and sildenafil on erectile function in diabetic rats.” isimli çalışma, 2006 yılında ABD Las Vegas’da düzenlenen “Sexual Medicine Society Meeting” de ve yine aynı yıl Antalya’da düzenlenen 19. Ulusal Türk Üroloji Kongresinde “En İyi Proje Ödülü”nü almıştır. İngilizce ve Almanca bilmektedir.

EKLER



Biochemical and cytochemical evaluation of heterozygote individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency

Nilgun Gurbuz^{a,*}, Tevfik Aslan Aksu^a, Cornelis J.F. Van Noorden^b

^aDepartment of Biochemistry, Akdeniz University, Faculty of Medicine, 07070 Antalya, Turkey

^bDepartment of Histology and Cell Biology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Meibergdreef 15, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands

Received 22 March 2005; received in revised form 24 June 2005; accepted 28 June 2005

KEYWORDS

G6PD deficiency;
Cytochemistry;
Erythrocyte;
G6PD staining;
Heterozygous G6PD
deficiency

Summary

The aim of this study was to diagnose heterozygous glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficient females by an inexpensive cytochemical G6PD staining method that is easy to perform, allowing diagnosis of G6PD deficiency without cumbersome genetic analysis. Three subject groups were included in the study. The first group consisted of 15 hemizygous deficient males. The second and the third group were composed of 15 heterozygous deficient females and 15 healthy individuals, respectively. Biochemical determination and cytochemical staining of G6PD activity were performed in samples of all subjects. Results obtained with the cytochemical staining method correlated significantly with the biochemical data ($p < 0.001$), but a only 51–68% of the erythrocytes were stained positively in females with normal biochemical G6PD activity despite their having a G6PD-deficient child. This observation clearly indicates that these individuals are heterozygously deficient. These findings show that the cytochemical staining method to detect G6PD activity in erythrocytes is reliable, sensitive and specific and is superior to the biochemical method. Therefore, this method can be used routinely to detect heterozygous G6PD deficiency.

© 2005 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) (EC 1.1.1.49) is a housekeeping enzyme that catalyzes the first and rate-limiting step in the pentose phosphate pathway. Its key role in metabolism is to

*Corresponding author. Tel.: +90 242 227 43 43x44125;
fax: +90 242 227 44 95.

E-mail addresses: ngurbuz@akdeniz.edu.tr (N. Gurbuz),
taksu@akdeniz.edu.tr (T.A. Aksu), c.j.vannoorden@amc.uva.nl
(C.J.F. Van Noorden).

provide reducing power in the cytoplasm in the form of NADPH. This role is particularly important in red blood cells where NADPH is required for detoxification of hydrogen peroxide and other compounds, via reduced glutathione (Beutler, 1994; Lee et al., 1993). G6PD deficiency is the most common congenital enzyme deficiency in men, present in over 400 million people worldwide (Salvati, 1999). Human G6PD, a homodimer encoded by a gene which maps to the region Xq28 on the X chromosome, exhibits an extraordinary degree of genetic variability: more than 150 deficient variants have been reported and characterized (Beutler, 1990; Roos et al., 1999). Therefore, full manifestation of the defective gene is found in the male hemizygote and the female homozygote. In the female heterozygote, however, a mixed population (mosaic) of normal and enzyme deficient cells can be found. This is a result of random inactivation of one of the X-chromosomes (Lyon, 1961; Van Noorden et al., 1982; Gurbuz et al., 2004).

Hemizygotously and homozygotously deficient patients can be easily detected. However, heterozygotously deficient females show G6PD activity levels in erythrocytes that are close to normal levels and are diagnosed as normal. Therefore, they cannot be detected by qualitative or quantitative biochemical methods. For the detection of these cases, a sensitive cytochemical staining method for G6PD activity in individual erythrocytes has been developed by Van Noorden et al. (1982), and is based on the reduction of a tetrazolium salt, tetranitro blue tetrazolium (TNBT), via an exogenous electron carrier, 1-methoxyphenazine methosulphate (1-methoxyPMS; Fig. 1), in a viscous medium containing polyvinyl alcohol (PVA; Van Noorden, 1984; Van Noorden and Vogels, 1985; Van Noorden et al., 1982). Such a cytochemical assay can be an excellent tool for discrimination between healthy persons and heterozygotously, hemizygotously and homozygotously G6PD-deficient patients by the analysis of individual cells.

The aim of the present study was to diagnose heterozygotous females with G6PD Mediterranean variant by this inexpensive cytochemical G6PD staining method that is relatively easy to perform. Our study differs from the previous studies, because the patient population in our study is different. G6PD is a very common disease in the Southern part of Turkey. In our country, we have Mediterranean variants of the G6PD deficiency (Akoglu et al., 1986; Aksu et al., 1990; Keskin et al., 2002). It is well known that G6PD variants have different characteristics. Therefore, we could not predict the results of this cytochemical method on

Mediterranean variants. To the best of our knowledge, this is the first study performed in a Turkish population where different Mediterranean variants exist. Successful accomplishment of this specific aim allows diagnosis of G6PD deficiency without expensive and difficult genetic analysis.

Materials and methods

Subjects

- The hemizygotous G6PD-deficiency group included 15 male patients who were previously diagnosed as deficient, and were between 0–20 years of age;
- The heterozygotous G6PD-deficiency group included 15 females who are mothers of hemizygotous patients. These subjects, within the age range of 25–45 years, were apparently healthy.

None of these subjects had ever experienced an acute hemolytic crisis;

- The control group was composed of 15 healthy subjects.

Written informed consent was obtained from all subjects.

Biochemical G6PD activity determination

Blood samples were obtained by venipuncture and collected in vacutainers containing heparin (15 IU/ml). Erythrocytes were separated by centrifugation at 800 g for 10 min and washed twice with isotonic saline. G6PD activity was determined by the "modified Zinkham method" in these packed cells (WHO, 1967). Enzyme activity was expressed as international units per gram hemoglobin (IU/g Hb).

Cytochemical staining method for G6PD activity

Blood samples were obtained by venipuncture and collected in heparinized tubes.

- In the first step, blood samples were incubated in 180 mM sodium nitrite for 8 min at room temperature for the conversion of all oxyhemoglobin into methemoglobin in order to prevent nonspecific formazan production.
- In the second step, packed cells were incubated with 20 mM NADP⁺ for 10 min at room

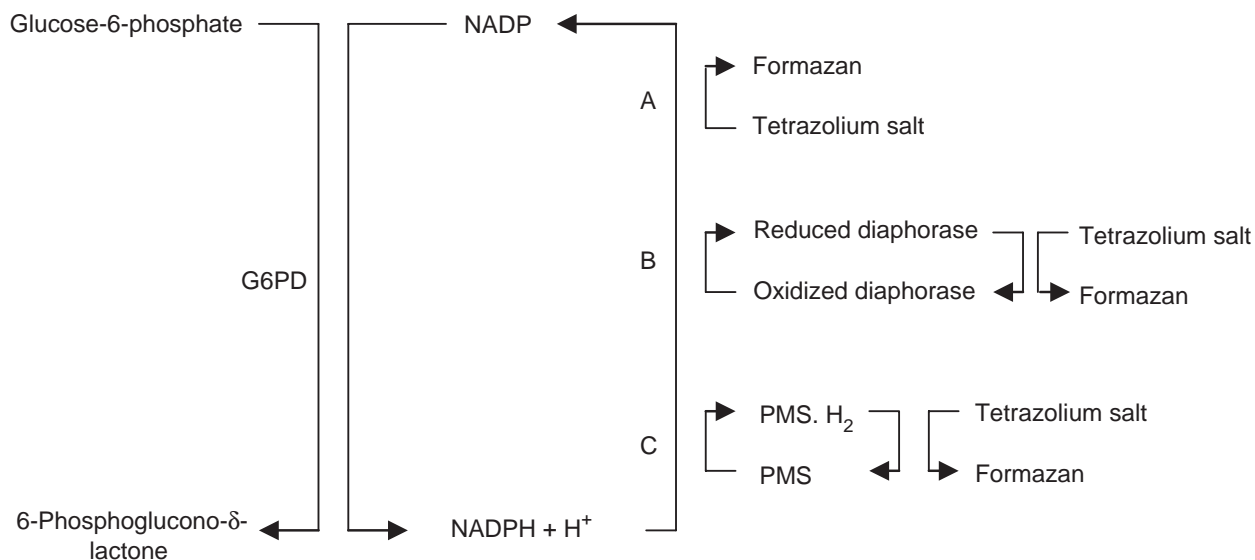


Figure 1. Schematic representation of tetrazolium salt reduction by G6PD activity. (A) Reduction without intervention of an electron transport system; (B) reduction via an endogenous electron transport system (diaphorase); (C) reduction via an exogenous intermediate electron carrier (PMS) (Van Noorden, 1984).

temperature before fixation in order to protect the active site of G6PD during fixation.

- In the third step, packed cells were incubated with 0.025% glutaraldehyde for 30 min at room temperature with continuous rotation of the tubes. This very mild treatment is sufficient to make the cell membrane permeable to the compounds needed for the staining reaction within the cells.
- In the fourth step, packed cells were incubated with the cytochemical medium for staining of G6PD activity. The incubation was carried out for 90 min at 46 °C in darkness, with continuous rotation. The cytochemical medium consisted of 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 10 mM G6P, 0.8 mM NADP⁺, 4 mM MgCl₂, 0.32 mM 1-methoxy-PMS, 5 mM NaN₃ and 1 mM tetranitro BT. PVA grade G04/140 (20%, w/v) was added to this medium.

We tried to discriminate G6PD-positive and G6PD-negative erythrocytes on the basis of this method. Therefore, we tested incubation media containing 10%, 20%, 30%, 35% or 40% PVA to determine the best concentration of PVA to distinguish G6PD-positive and G6PD-negative cells. As a result, we found 20% PVA to be the optimum condition, because the higher amounts of PVA in the media (30%, 35% and 40%) resulted in incomplete dissolving and too viscous media, preventing compounds diffusing effectively into the erythrocytes.

Finally, discrimination was made between negative cells and positive cells, containing a substantial amount of G6PD activity. Microscopic screening of blood samples stained for G6PD activity was performed routinely within a few minutes, as described by Van Noorden (1984).

Statistical analysis

Results were expressed as mean ± standard error (SE). Statistical comparisons between groups were performed by the one-way Anova test. Multiple comparisons between groups were done by Tukey HsD Post Hoc tests and *p* values <0.05 were accepted as statistically significant. Correlations between biochemical G6PD activities and ratios of positive cells were shown by calculating Pearson correlation coefficients.

Results

Biochemically determined G6PD activity in erythrocytes of control subjects and heterozygously and hemizygotously G6PD-deficient patients are shown in Fig. 2. Enzyme activity was not detectable in the hemizygotous group, whereas activity in the heterozygotously G6PD-deficient group ranged between 0.8–4.7 IU/gHb. G6PD activity was significantly lower in the heterozygotously deficient group as compared with the control group that showed

G6PD activity between 5.3 and 8.7 IU/gHb. Differences between groups were highly significant.

Figure 3 demonstrates G6PD-positive cells in the three subject groups as detected cytochemically. The ratio of positive cells were significantly lower in heterozygous and hemizygous deficient groups as compared to controls ($p < 0.001$). Additionally, the ratio of positive cells in the hemizygous group was significantly lower than the heterozygous group ($p < 0.001$).

In Fig. 4A a photomicrograph of erythrocytes of a healthy person is shown after staining for G6PD activity by the optimized method in the presence of the substrate. Tetranitro BT-formazan precipitated as very fine granular deposits inside cells only. Clear differences in amounts of precipitate per individual erythrocyte were observed. In Fig. 4B, erythrocytes, which were also stained for G6PD activity

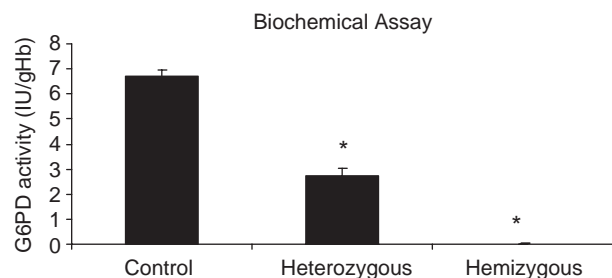


Figure 2. G6PD activity as detected biochemically in erythrocytes of control subjects and, heterozygous and hemizygous G6PD-deficient subjects (mean \pm SE, $n = 15$ for each group). *All three groups are significantly different ($p < 0.001$).

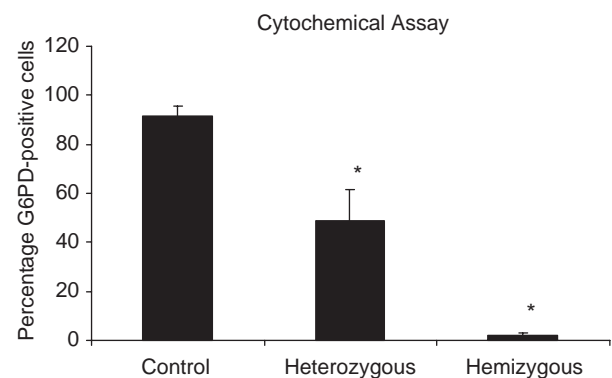


Figure 3. Percentage of erythrocytes that are positive for G6PD activity, as detected cytochemically in control subjects and, heterozygous and hemizygous G6PD-deficient subjects (mean \pm SE, $n = 15$ for each group). *All three groups are significantly different ($p < 0.001$).

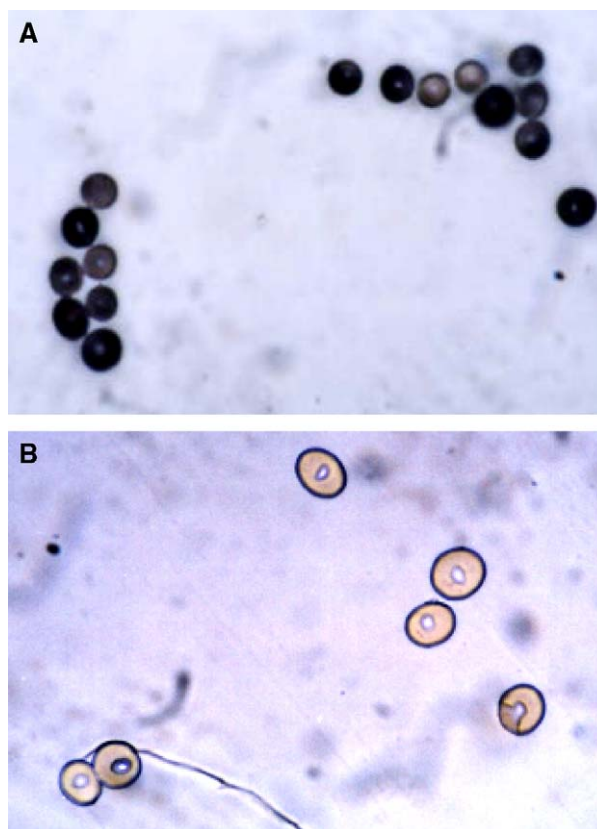


Figure 4. Erythrocytes of a healthy person stained cytochemically for G6PD activity in the presence (A) and absence (B) of substrate. Magnification $\times 100$.

but in the absence of G6P, did not show any formazan production inside the cells.

Figure 5A shows erythrocytes of a heterozygously deficient patient after staining for G6PD activity in the presence of substrate. All blood samples from heterozygotes contained both a population of cells without any noticeable amount of formazan and a population of formazan-containing cells with various amounts of color production. In the heterozygous samples, the size of the two populations was similar. Figure 5B shows erythrocytes of a hemizygous deficient patient after staining for G6PD activity in the presence of G6P. Blood samples of these cases contained G6PD-negative erythrocytes.

The comparison between the cytochemical analysis and the biochemical analysis of G6PD activity in all samples of erythrocytes are shown in Fig. 6 and heterozygously deficient patients in Fig. 7. Figure 7 shows that 20% of heterozygously deficient patients have a normal biochemical activity, whereas the cytochemical assay shows clearly that each blood sample contains a population of red blood cells that are negative for G6PD activity.

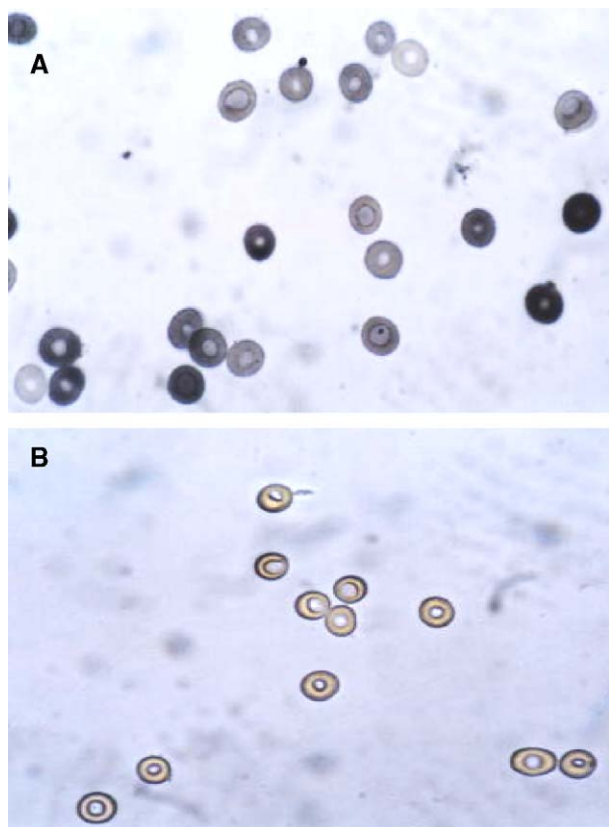


Figure 5. Erythrocytes stained cytochemically for G6PD activity of a person with heterozygous G6PD deficiency (A) and a patient with homozygous G6PD deficiency (B). Magnification $\times 100$.

Discussion

G6PD deficiency is the most common congenital enzyme deficiency in humans, present in over 400 million people worldwide (Salvati et al., 1999). For the detection of this frequently occurring genetic disorder, qualitative and quantitative screening tests have been developed. The qualitative fluorescent spot test is easy, inexpensive, has practical technical properties and correlates well with quantitative tests (Wolf et al., 1987). However, detection of heterozygously G6PD-deficient subjects was difficult by the fluorescent spot test, because at least 46% of the deficient subjects tested showed normal fluorescent values. The discrimination between hemizygotous deficient male patients or homozygotous deficient female patients and normal individuals is relatively simple on the basis of the biochemical determination of the G6PD activity in hemolysates (Beutler, 1971). The diagnoses of hemizygotous male or homozygotous female patients with G6PD-deficiency are performed in our routine laboratory by the biochemical assay, which

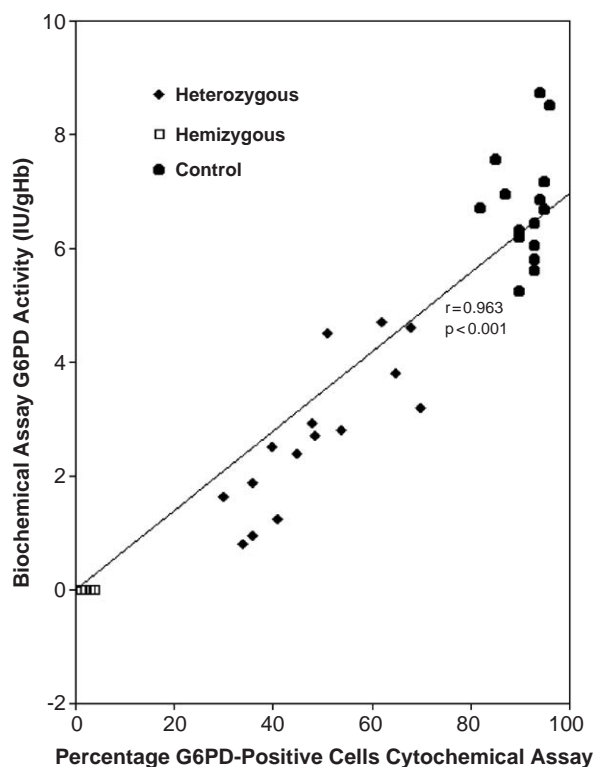


Figure 6. Comparison between the cytochemical analysis and the biochemical analysis of G6PD activity in samples of erythrocytes taken from healthy subjects and from heterozygotously and hemizygotously G6PD-deficient subjects. The biochemical data are expressed as international units G6PD activity per g hemoglobin (IU/gHb) and the cytochemical data as the percentage of cells positive for G6PD activity.

was developed by the WHO (1967). On the other hand, for the detection of heterozygotous females, the routine screening tests are not very reliable. The biochemical assay in hemolysates fails to detect at least 60% of the heterozygotous (Vogels et al., 1986; Wolf et al., 1987). Cytochemical techniques based on endogenous oxidoreductase systems (Fig. 1B) have been important to detect erythrocytes in G6PD deficiency (Beutler, 1978). Fairbanks and Lampe (1968) described a cytochemical assay for the estimation of G6PD activity in individual erythrocytes. This technique was based on the reduction of the tetrazolium salt MTT into its formazan by NADPH generated by G6PD activity via the exogenous electron carrier Nile blue sulphate and methemoglobin. However, the method did not show sufficient localization properties, because formazan precipitates were found on inactive cells, after being produced in active cells (Stuart et al., 1975).

Van Noorden et al. (1982) described a new, sensitive cytochemical staining method to detect

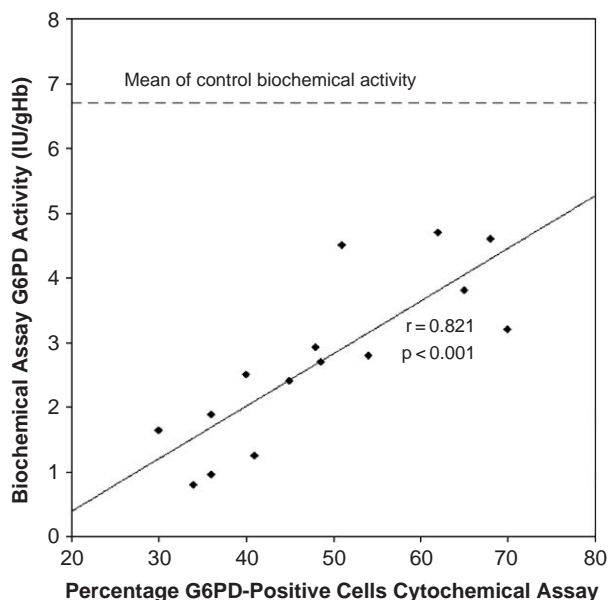


Figure 7. Comparison between the cytochemical analysis and the biochemical analysis of G6PD activity in samples of erythrocytes taken from heterozygously G6PD-deficient patients.

G6PD activity in human erythrocytes. Erythrocytes of healthy persons, and heterozygote and hemizygote patients could easily be distinguished (Van Noorden, 1984; Van Noorden and Vogels, 1985; Vogels et al., 1986).

The blood samples of the 15 hemizygote deficient patients contained 1–4% (mean 2.3%) positive cells, whereas the 15 heterozygotes and 15 healthy samples contained 30–70% (mean 48.6%) and 82–96% (mean 91.3%) positive cells, respectively. Control samples also contained some negative cells which are old erythrocytes, whereas the 1–4% positive cells in preparations of hemizygous patients are very young erythrocytes (Vogels et al., 1986).

When the biochemical data are compared with the cytochemical data of all samples tested, a significant correlation was observed ($r = 0.963$; $p < 0.001$). A significant correlation was also observed in samples of heterozygously deficient patients ($r = 0.821$; $p < 0.001$). This correlation showed that biochemically determined G6PD activity correlated with the percentage positive cells in heterozygote female subjects, who often show a normal G6PD activity in the biochemical test, while they are the mothers of sons with hemizygous deficiency. The cytochemical assay showed 51–68% positive cells in samples of these females. On the basis of our cytochemical findings, these females were diagnosed as heterozygously G6PD-deficient subjects.

In conclusion, it can be stated that female individuals who show an almost normal G6PD activity as detected biochemically but who have hemizygous deficient sons can be detected adequately by the cytochemical G6PD staining method. This method is as sensitive and specific as a genetic analysis, but costs less and is easier to perform. Therefore, the cytochemical G6PD staining method is a good supporting parameter to evaluate heterozygous deficient patients.

Acknowledgment

The study was supported by the Research Fund of the Akdeniz University, Antalya, Turkey as partial financial support of the Master of Science thesis of Nilgun Gurbuz.

References

- Akoglu T, Ozer FL, Akoglu E. The coincidence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hemoglobin S gene in Cukurova Province, Turkey. *Am J Epidemiol* 1986;123:677–80.
- Aksu TA, Esen F, Dolunay MS, Aliciguzel Y, Yucel G, Cali S, et al. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase (1.1.1.49) deficiency in Antalya province, Turkey: an epidemiologic and biochemical study. *Am J Epidemiol* 1990;131:1094–7.
- Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. New York: Grune and Stratton; 1971. p. 62–4.
- Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Stanbury JB, Wijngaarden JB, Frederickson DS, editors. *The metabolic basis of Inheritance*. New York: McGraw-Hill Press; 1978. p. 1430–51.
- Beutler E. The genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Semin Hematol* 1990;27:137–64.
- Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994;84:3613–36.
- Fairbanks VF, Lampe LT. A tetrazolium-linked cytochemical method for estimation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes: applications in the study of heterozygotes for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood* 1968;31:589–603.
- Gurbuz N, Yalcin O, Aksu TA, Baskurt OK. The relationship between the enzyme activity, lipid peroxidation and red blood cells deformability in hemizygous and heterozygous glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient individuals. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004;31:235–42.
- Keskin N, Ozdes I, Keskin A, Acikbas I, Bagci H. Incidence and molecular analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the province of Denizli, Turkey. *Med Sci Monit* 2002;8:CR453–6.

- Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and related deficiencies involving the pentose phosphate pathway and glutathione metabolism. In: Lee GR, editor. Wintrobe's clinical hematology. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p. 1006–16.
- Lyon MF. Gene action in the X chromosome of the mouse (*Mus musculus* L). *Nature* (Lond) 1961;190:372–3.
- Roos D, Van Zwieten R, Wijnen JT, Gomez-Gallego F, De Boer M, Stevens D, et al. Molecular basis and enzymatic properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase volendam, leading to chronic non-spherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood* 1999;94:2955–62.
- Salvati AM, Maffi D, Caprari P, Pasquino MT, Caforio MP, Tarzia A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hereditary hemolytic anemia. *Ann Ist Super Sanita* 1999;35:193–203.
- Stuart J, Gordon PA, Lee TR. Enzyme cytochemistry of blood and marrow cells. *Histochem J* 1975;7:471–87.
- Van Noorden CJ. Histochemistry and cytochemistry of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Prog Histochem Cytochem* 1984;15:1–85.
- Van Noorden CJ, Vogels IM. A sensitive cytochemical staining method for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes. II. Further improvements of the staining procedure and some observations with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Br J Haematol* 1985;60:57–63.
- Van Noorden CJ, Vogels IM, James J, Tas J. A sensitive cytochemical staining method for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes. I. Optimization of the staining procedure. *Histochemistry* 1982;75:493–506.
- Vogels IM, Van Noorden CJ, Wolf BH, Saelman DE, Tromp A, Schutgens RB, et al. Cytochemical determination of heterozygous glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in erythrocytes. *Br J Haematol* 1986;63:402–5.
- WHO. Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Tech Rep Ser* 1967;366:5–53.
- Wolf BH, Weening RS, Schutgens RB, Van Noorden CJ, Vogels IM, Nagelkerke NJ. Detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in erythrocytes: a spectrophotometric assay and a fluorescent spot test compared with a cytochemical method. *Clin Chim Acta* 1987;168:129–36.